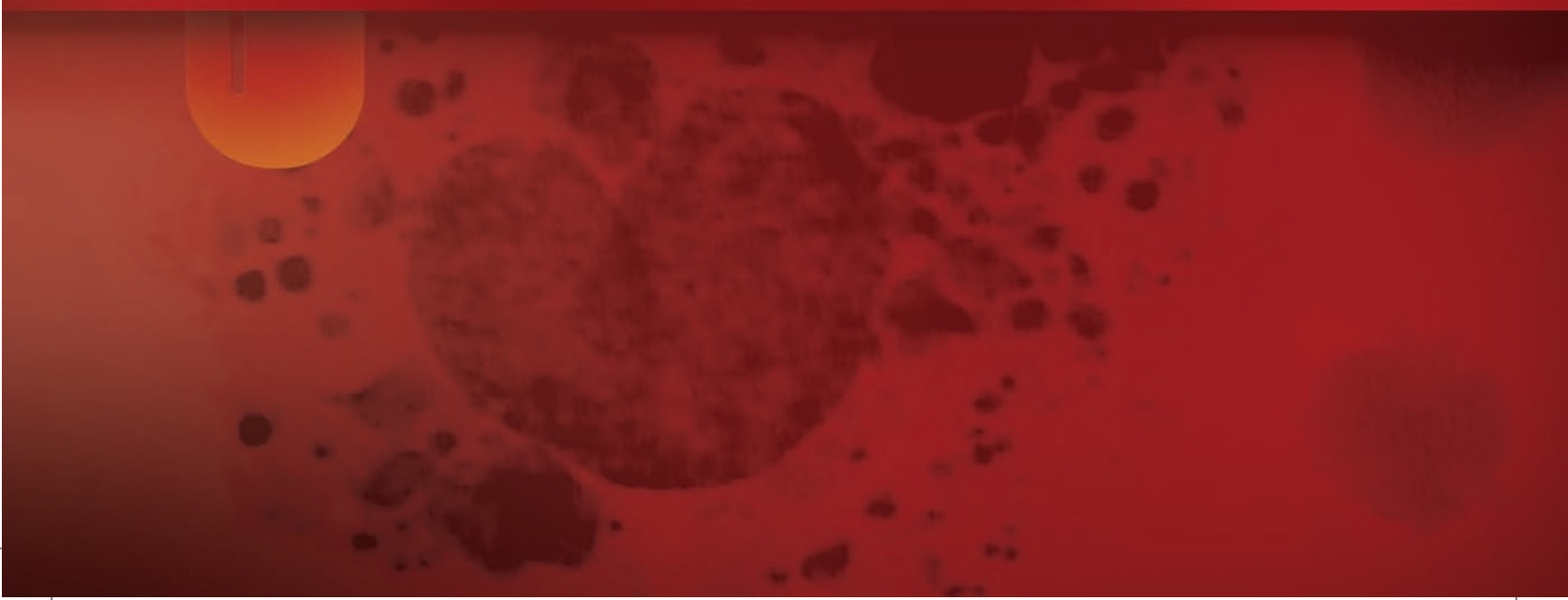
MÁRCIO MELO | CRISTINA MAGALHÃES DA SILVEIRA

LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA

TEORIAS, TÉCNICAS E ATLAS



Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 2 24/09/2014 08:14:02

Laboratório de Hematologia – Teorias, Técnicas e Atlas

Márcio Antonio Wanderley de Melo

Coordenador Científico do Setor de Hematologia do Laboratório Marcelo Magalhães, Recife.

Coordenador do Setor de Hematologia do Hospital Dom Silvério Gomes Pimenta (Hospital São Camilo), SP, e do Setor de Hematologia do Laboratório da Santa Casa de Suzano, SP.

Professor do Curso de Pós-Graduação em Hematologia e Banco de Sangue da Academia de Ciências e Tecnologia – São José do Rio Preto, SP.

Professor da disciplina Citologia do Sangue Periférico na especialização em Hematologia da Universidade de Pernambuco (UPE).

Professor do Curso de Pós-Graduação em Hematologia Laboratorial na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Professor do Curso de Pós-Graduação em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial no Centro de Capacitação Educacional (CCE).

Palestrante de Congressos Brasileiros de Farmácia e da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC).

Membro Citologista da Aliança Brasil de Mucopolissacaridoses.

Mestrado em Ciências da Saúde na área de Hematologia pela Faculdade de Ciências Médicas da UPE.

Especialista em Hematologia e Banco de Sangue pela Academia de Ciência e Tecnologia – São José do Rio Preto, SP.

Biomédico pela UFPE.

Cristina Magalhães da Silveira

Coordenadora do Setor de Hematologia do Laboratório Marcelo Magalhães.

Auditora interna do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC).

Especialista em Hematologia e Banco de Sangue pela Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.

Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Citologista em Hematologia com 20 anos de experiência.

RUBIO

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 3 24/09/2014 08:14:02

Laboratório de Hematologia – Teorias, Técnicas e Atlas
Copyright © 2015 Editora Rubio Ltda.
ISBN 978-85-8411-011-7

Todos os direitos reservados.
É expressamente proibida a reprodução
desta obra, no todo ou em parte,
sem autorização por escrito da Editora.

Produção e Capa
Equipe Rubio

Capa
Bruno Sales

Diagramação
Elza Maria da Silveira Ramos

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

L111 Laboratório de hematologia: teorias, técnicas e atlas / Márcio Antonio Wanderley de Melo / Cristina Magalhães da Silveira – 1. ed. – Rio de janeiro: Rubio, 2015.
288p.: il.; 28 cm.

Inclui bibliografia e índice
ISBN 978-85-8411-011-7

1. Células sanguíneas. 2. Hematologia. 3. Microscopia médica. 4. Hematologia – Atlas. I. Silveira, Cristina Magalhães da. II. Melo, Márcio Antonio Wanderley de. III. Silveira, Cristina Magalhães da. IV. Título.

14-15970 CDD: 616.1507561
CDU: 616.15-076

RUBIO

Editora Rubio Ltda.
Av. Franklin Roosevelt, 194 s/l 204 – Castelo
20021-120 – Rio de Janeiro – RJ
Telefax: 55(21) 2262-3779 • 2262-1783
E-mail: rubio@rubio.com.br
www.rubio.com.br

Impresso no Brasil
Printed in Brazil

Colaboradores

AGNES CRISTINA M. DE MESQUITA CAVALCANTI

Biomédica pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com experiência em Hematologia no Hospital Correia Picanço, e no Laboratório Marcelo Magalhães, Recife, PE.

CYMARA RÚBIA RAMOS DE ALENCAR

Biomédica pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com experiência em Citologia Hematológica no Hospital Português, no Hemocentro de Pernambuco (Hemope) e no Laboratório Marcelo Magalhães.

Especialização em Biologia Molecular pela Universidade de Pernambuco (UPE).

DIEGO ARRUDA FALCÃO

Mestre em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Biomédico pela UFPE com experiência em Citologia Hematológica.

EMILTON JOSÉ DIAS PEREIRA

Hematologista do Hemocentro de Pernambuco (Hemope) e do Instituto de Hematologia do Nordeste (IHENE).

Faz parte da equipe de Transplante de Medula Óssea do Hemope.

HELINETE BALTAZAR RIBEIRO FILGUEIRAS

Auditora do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC).

Leader Assessor da ISO 9001.

Avaliadora do Modelo de Excelência em Gestão (MEG).

Consultora dos Programas ISO 9000 e PALC.

Coordenadora de Qualidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce).

MBA Executivo em Saúde pela Fundação Getúlio Vargas (FGV), Fortaleza, CE.

Palestrante do Congresso da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

Ministra cursos na área de Biossegurança, Controles da Qualidade, Norma PALC e Requisitos da ISO 9001.

Farmacêutica-Bioquímica graduada pela Universidade Federal do Ceará (UFC).

MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA

Professor Adjunto em regime de tempo integral e dedicação exclusiva (Hematologia) lotado no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Membro Permanente do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE.

Pesquisador Colaborador da Fundação do Hemocentro de Pernambuco (Hemope).

Doutorado em Fisiopatologia Médica na área de Hematologia pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), SP.

Mestrado em Clínica Médica na área de Hematologia e Biologia Molecular pela Unicamp, SP.

Biomédico pela Universidade Federal de Pernambuco (UPE).

Proficiência Técnica em Laboratório de Hematologia pela Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

MARIANA REZENDE BANDEIRA DE MELLO

Doutora em Fisiopatologia Médica pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), SP, com experiência em Citologia Hematológica no Laboratório Marcelo Magalhães, Recife, PE.

Mestre em Clínica Médica pela Unicamp, SP.

Especialização em Patologia Clínica na Universidade de Pernambuco (UPE).

Biomédica pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

PATRÍCIA MARKMAN

Gerente da Agência Transfusional do Hospital dos Servidores do Estado de Pernambuco.

Integrante do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hemocentro de Pernambuco (STMO/Hemope).

Especialista em Hematologia e Membro da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO).

TEREZINHA DE JESUS MARQUES SALLES

Onco-hematologista Pediátrica do Centro de Oncologia e Hematologia de Pernambuco (CEONHPE) do Hospital universitário Oswaldo Cruz (HUOC).

Doutora na área de Genética pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Especialização (Residência) em Clínica Médica na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 6 24/09/2014 08:14:02

Dedicamos este livro a Maíra, Diogo, Ringo e Eduardo.

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 7 24/09/2014 08:14:02

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 8 24/09/2014 08:14:02

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer especialmente ao Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, por sua grande contribuição e dedicação para a produção deste livro.

Agradecemos em particular a:

Dr. Sérgio Magalhães, Dr. Marcelo Magalhães e a todos os colaboradores do Laboratório Marcelo Magalhães (Recife-PE).

Profª Drª Dayse Lima, Drª Graça Mattos e Dr. Marcelo Magalhães Neto do Centro Integrado de Colposcopia e Citopatologia – CICC (Recife-PE).

Profª Drª Maria do Socorro Cavalcanti da Universidade de Pernambuco (UPE).

Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum, Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum e equipe da Academia de Ciências e Tecnologia – ACeT (São José do Rio Preto-SP).

Fotógrafa Daniela Nader (Recife-PE).

Thiago Gregolin, Fabio Rubio e a todos os colaboradores da Editora Rubio (Rio de Janeiro-RJ).

Cleber Lins, da Médica-Roche.

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 9 24/09/2014 08:14:02

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 10 24/09/2014 08:14:02

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 12 24/09/2014 08:14:02

Prefácio

A cada ano, a Hematologia avança rapidamente com novos conhecimentos sobre as doenças hematológicas e suas fisiopatologias, o que invariavelmente repercute na necessidade de se aprimorar o raciocínio clínico e o diagnóstico laboratorial dessas doenças. No laboratório, o desafio consiste na incorporação de recursos diagnósticos mais modernos e sofisticados, sem perder o foco e a qualidade nas análises clássicas, fundamentalmente a interpretação do hemograma e a análise morfológica das células sanguíneas. Desse modo, o livro *Laboratório de Hematologia – Teorias, Técnicas e Atlas* transporta o leitor de modo didático, prático e objetivo ao universo complexo das alterações e doenças hematológicas, sejam estas benignas ou neoplásicas, além de oferecer uma abordagem técnica com relação aos procedimentos manuais e automatizados em Hematologia. Ao longo dos capítulos, os temas de maior importância com relação às alterações das séries vermelha, branca e plaquetária são abordados com enfoque laboratorial prático e abrangente, mas com o cuidado de auxiliar o leitor por meio de um grande número de imagens de esfregaços sanguíneos e gráficos de apoio. Útil a todos os profissionais envolvidos com o diagnóstico laboratorial em Hematologia, o livro é um importante aliado do estudo e da consulta na bancada de laboratório.

Flávio Augusto Naoum

Hematologista com Pós-Doutorado em Hemoglobinopatias pelo
North Middlesex University Hospital pelo e Royal London, Inglaterra.

Laboratorio de Hematologia - cap-00.indd 14 24/09/2014 08:14:03

Lista de abreviaturas

ADP	adenosina difosfato
AHAi	anemia hemolítica autoimune
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ANA	anticorpos antinucleares
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	anemia refratária
AREB	anemia refratária com excesso de blastos
AREB-t	anemia refratária com excesso de blastos, em transformação
ARSA	anemia refratária com sideroblasto em anel
ATLL	linfoma/leucemia de células T do adulto
ATP	adenosina trifosfato
AVEH	acidente vascular encefálico hemorrágico
CAE	cloroacetato esterase
CD	conjunto de diferenciação (*cluster of differentiation*)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDK	quinases dependentes de ciclina
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CIQ	controle interno de qualidade
CIVD	coagulação intravascular disseminada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO_2	dióxido de carbono
CV	coeficiente de variação
DECH	doença do enxerto contra o hospedeiro
DHL	desidrogenase lática
DHPN	anemia hemolítica perinatal
DP	desvio padrão
EBV	vírus Epstein-Barr
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoensimático
EPI	equipamentos de proteção individual
FAB	classificação franco-americano-britânico
FAN	fator antinúcleo
FISH	hibridação *in situ* por fluorescência

fL	femtolitros
FvW	fator von Willebrand
G-6-PD	glicose-6-fosfato-desidrogenase
GAG	glicosaminoglicanos
G-CSF	fator estimulante de colônias granulocíticas
GLU	ácido glutâmico
GM1	gangliosidose tipo 1
GPI	glicosilfosfaditilinositol
Hb	hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular média
HDW	amplitude de distribuição da hemoglobina
HPN	hemoglobinúria paroxística noturna
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglubilina M
IP	inibidores da protease
IPSS	International Prognostic Scoring System
LAGC	linfoma anaplásico de grandes células
LCM	linfoma de células do manto
LCR	líquido cefalorraquidiano
LDGC	linfoma difuso de grandes células B
LES	lúpus eritematoso sistêmico
LEZM	linfoma esplênico da zona marginal
LGL	distúrbio linfocítico de grandes células granulares
LIS	lisina
LLA	leucemia linfoide aguda
LLA-L1	leucemia linfoide aguda – subtipo 1
LLA-L2	leucemia linfoide aguda – subtipo 2
LLA-L3	leucemia linfoide aguda – subtipo 3
LLA-T	leucemia linfoide aguda de células T
LLC	leucemia linfoide crônica
LMA	leucemia mieloide aguda
LMA-M0	leucemia mieloide aguda – indiferenciada (LMA-M0)
LMA-M1	leucemia mieloide aguda – mieloblástica

LMA-M2	leucemia mieloide aguda – mieloblástica com maturação
LMA-M2v	leucemia mieloide aguda – mieloblástica com maturação – variante
LMA-M3	leucemia mieloide aguda promielocítica hipergranular
LMA-M3v	leucemia mieloide aguda promielocítica hipogranular – variante
LMA-M4	leucemia mieloide aguda mielomonocítica
LMA-M4eo	leucemia mieloide aguda - mielomonocítica com eosinofilia
LMA-M5a	leucemia mieloide aguda – monoblástica sem maturação
LMA-M5b	leucemia mieloide aguda – monocítica com maturação
LMA-M6	leucemia mieloide aguda – eritroleucemia
LMA-M7	leucemia mieloide aguda – megacarioblástica
LMC	leucemia mieloide crônica
LMMC	leucemia mielomonocítica crônica
LMMJ	leucemia mielomonocítica juvenil
LNH	linfoma não Hodgkin
LPL-B	leucemia prolinfocítica de células B
LTP	linfomas de células T
MALT	linfomas de tecido linfoide associado a mucosas
MF/SS	micose fungoide/síndrome de Sézary
MHC	complexo maior da histocompatibilidade
MPO	mieloperoxidase
MPS	mucopolissacaridose
NCCLS	National Commitee on Clinical Laboratory Standards
NK	células exterminadoras naturais (*natural killers*)
O2	oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONA	Organização Nacional de Acreditação
PAI	pesquisa de anticorpos irregulares
PAI-1	inibidor da ativação do plasminogênio
PALC	Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos

PAS	ácido periódico-Schiff
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCT	plaquetócrito
PDW	amplitude de distribuição das plaquetas
pg	picogramas
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
POP	procedimentos operacionais padronizados
PPBL	linfocitose persistente policlonal de células B
PPP	plasma pobre em plaquetas
PTI	púrpura trombocitopênica idiopática
PTT	púrpura trombocitopênica trombótica
RDC	Resoluções da Diretoria Colegiada
RDW	distribuição do tamanho das hemácias
RFC	reação de fixação do complemento
RNA	ácido ribonucleico
SBAC	Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
SBPC/ML	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial
SMD	síndromes mielodisplásicas
TARV	terapia antirretroviral combinada
TAT	tempo de resposta
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDA	teste direto de antiglobulina
TE	trombocitemia essencial
TP	tempo de protrombina
TT	tempo de trombina
TTPA	tempo de tromboplastina parcial ativado
VAL	valina
VCM	volume corpuscular médio
VHA	vírus da hepatite A
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
VHS	velocidade de hemossedimentação
VPM	volume plaquetário médio

Sumário

1 Coleta de Sangue no Laboratório de Hematologia 1

Recepção/cadastro 1
Técnica de coleta 2
Esfregaço sanguíneo 4
Coloração 6

2 Qualidade no Laboratório de Hematologia 9

Histórico da qualidade 9
Qualidade em hematologia 9
Fase pré-analítica 10
Fase analítica 11
Fase pós-analítica 17

3 Hemácias 19

Hemácias 19
Anemias carenciais 50
Hemoglobinopatias 52
Enzimopatias eritrocitárias 60
Anemia hemolítica causada por anormalidades na membrana celular 64
Anemias hemolíticas adquiridas não imunes 67
Anemias hemolíticas autoimunes 69
Anemias por disfunção medular 73
Outras alterações das hemácias 75

4 Leucócitos 77

Introdução 77
Neutrófilos 77
Eosinófilos 83
Basófilos 83
Linfócitos 83
Monócitos 85
Citologia das inclusões leucocitárias 97
Atipias linfocitárias causadas por doenças infecciosas 108
Leucemias agudas 113
Doenças mieloproliferativas crônicas 127
Síndromes mielodisplásicas 135
Doenças linfoproliferativas crônicas 137
Doenças das células plasmáticas 141
Linfomas 148

5 Plaquetas 161

Plaquetas normais 161
Plaquetograma 163
Doenças hereditárias da função das plaquetas 164
Distúrbios adquiridos das plaquetas 168
Distúrbios hemorrágicos hereditários 169
Satelitismo plaquetário 170

6 Líquidos Biológicos no Laboratório de Hematologia 171

Introdução 171
Líquido cefalorraquidiano 171
Líquido pleural 179
Líquido pericárdico 186
Líquido peritoneal/ascítico 187
Líquido sinovial 190
Lavado/escovado broncoalveolar 191
Teste de Hansel-Shimizu 194

7 Técnicas Manuais no Laboratório de Hematologia 201

Introdução 201
Teste de falcização das hemácias 201
Contagem de reticulócitos 201
Pesquisa de corpos de Heinz e agregados de hemoglobina H 202
Coloração intraeritrocitária de Hb fetal 203
Velocidade de hemossedimentação (VHS), método Wintrobe e Westergren 203
Teste de solubilidade em tubo e papel filtro 205
Teste de Brewer ou pesquisa de deficiência de G6PD 206
Teste de Ham 207
Curva de fragilidade osmótica das hemácias 207
Pesquisa de acantócitos 207
Pesquisa de siderócitos ou corpúsculos de Pappenheimer – coloração de Perls 208
Contagem total de hemácias em câmara de Neubauer 208
Eletroforese das hemoglobinas 209
Contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer 209

Contagem de plaquetas pelo método de Fônio.....210
Contagem de plaquetas pelo método de Brecher 212
Pesquisa de hematozoários 212
Pesquisa de células LE.....214
Teste de Hansel – citologia nasal.....214
Tempo de sangramento (método de Duke) 215
Tempo de sangramento (método de Ivy).....215
Tempo de coagulação 217
Fibrinogênio 218
Prova do laço.....218
Grupo sanguíneo ABO – técnica em tubo.....219
Fator Rh "D" em tubo 221
Pesquisa de "D" fraco 221
Coombs direto.....222
Pesquisa de anticorpos irregulares 222
Prova de compatibilidade (prova cruzada) 223
Hemaglutinação em gel.....224

8 Técnicas Automatizadas.....227

Hemograma automatizado 227
Velocidade de hemossedimentação automatizado 228
Reticulócito automatizado.....229
Fibrinogênio automatizado 230
Proteína C.....231
Proteína S 232
Antitrombina 232
Anticoagulante lúpico 232
Tempo de protombina.....233
Tempo de tromboplastina parcial ativada.....233
Tempo de trombina.....233
D-dímero.....233

9 Técnicas Especiais 235

Citogenética.....235
Imunofenotipagem.....236
Citoquímica.....237

10 Princípios Básicos da Onco-hematologia.....241

Quimioterapia 241
Radioterapia 242
Transplante de medula óssea.....242
Estimuladores da população granulocítica.....243

11 Destaques e Curiosidades.....245

Mitose 245
Bastonetes de Auer 245
Relação núcleo/citoplasma 245
Bubbles.....245
Contagem e distribuição dos leucócitos na lâmina.....245
Eosinófilos de cavalo.....248
Células endoteliais no esfregaço sanguíneo 248
Células epiteliais bucais no esfregaço sanguíneo.....248
Cromatina sexual nos neutrófilos 250
Células LE.....252
Apoptose de neutrófilos.....253
Pseudoanomalia de Pelger-Hüet.....254
Hemácias "cruzadas" 254
Formação da sombra nuclear.....255

Bibliografia Consultada 257

Índice 259

1

Coleta de Sangue no Laboratório de Hematologia

RECEPÇÃO/CADASTRO

Durante o cadastro do paciente e o registro dos exames solicitados na guia médica, é muito importante solicitar os dados pessoais, como: idade, sexo, endereço, telefone, exercício físico, gestação, menstruação, tabagismo, utilização de medicações e horas de jejum. Isso porque, no setor de hematologia, o jejum para o hemograma e os testes de coagulação deve ser de 4h. Informações sobre os dados clínicos com uso de medicações, quimioterapia, radioterapia e doenças crônicas também fazem parte do cadastramento.

O método mais seguro e confiável para armazenar informações do paciente é feito por meio do código de barras, pois praticamente anula a possibilidade de troca de amostras, já que os equipamentos automatizados têm leitores de código de barras, identificando, lendo e enviando os resultados interfaceados (ferramenta de movimentação de informações entre sistemas) para liberação. Quando na solicitação médica houver exames que envolvem mais de um setor do laboratório clínico, deve-se acompanhar a sequência dos tubos a vácuo, recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) de acordo com a NR32 – uma norma regulamentadora de segurança e saúde no trabalho que segue as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

TUBOS DE COLETA DO SETOR DE HEMATOLOGIA

Os tubos de coleta do setor de hematologia são os seguintes (Figura 1.1):

- **Tubo de tampa azul (coagulação)**: com o anticoagulante citrato de sódio.

Figura 1.1 Sequência de tubos utilizados na coleta. O primeiro é o frasco (vidro) de hemocultura; o segundo tubo (plástico) de tampa branca é seco, sem aditivos (dosagens de metais); o terceiro tubo de tampa azul contém o anticoagulante citrato de sódio (análises de coagulação); o quarto tubo é seco com tampa vermelha e contém ativador de coágulo (análises imuno-hematológicas); o quinto tubo de tampa amarela contém gel separador e ativador de coágulo (análises bioquímicas e sorológicas); o sexto tubo, de tampa verde, contém o anticoagulante heparina (gasometria e análises bioquímicas); o sétimo tubo, de tampa roxa, contém o anticoagulante EDTA (análises hematológicas); e o oitavo tubo com tampa cinza contém fluoreto de sódio, que é um inibidor de glicólise (análise da glicemia)

- **Tubo de tampa vermelha (imuno-hematologia)**: sem anticoagulante.
- **Tubo de tampa roxa (hematologia e imuno-hematologia)**: com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético).

As Figuras 1.2 e 1.3 apresentam, respectivamente, a maneira correta de se cadastrar o exame e o material utilizado para a coleta.

Figura 1.2 Cadastro de exames: código de barras nos tubos do setor de hematologia (análises de coagulação, imuno-hematológica e hematológica)

Figura 1.3 Material utilizado na coleta de exames do setor de hematologia: lâminas, garrote ou torniquete, álcool isopropílico 70% ou álcool etílico, algodão, luvas descartáveis, adaptador de agulha, agulhas com travas de segurança, seringa, escalpe, tubos a vácuo, lancetas e bandagem séptica

TÉCNICA DE COLETA

Diversos locais podem ser escolhidos para a punção venosa. Entretanto, o local de preferência é a fossa antecubital, na área anterior do braço, onde está localizado um grande número de veias próximas à superfície da pele.

Nesta localização do braço, há dois tipos comuns de distribuição das veias, uma com o formato da letra H e outra com o formato da letra M. O padrão H é o mais comum e composto pelas veias cefálica, cubital mediana e basílica. Já o padrão M é composto pelas veias cefálica, cefálica mediana, basílica mediana e basílica (Figura 1.4).

Antes da coleta do sangue, é necessária a utilização de antissépticos (álcool isopropílico 70% ou álcool etílico). Com o algodão umedecido de antisséptico, deve-se deslizá-lo no local da coleta em movimento circular do centro para fora, a fim de não passar pelo mesmo local duas vezes. É importante não assoprar, não abanar, não colocar nada no local e não tocar novamente na região.

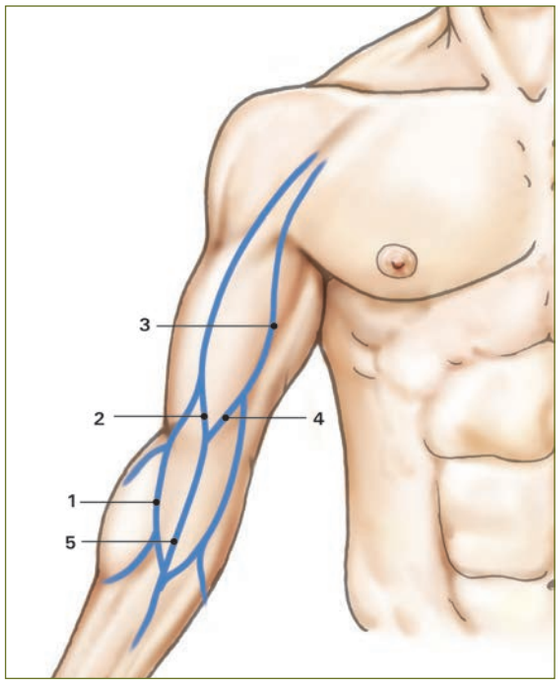


Figura 1.4 Distribuição das veias do membro superior: veia cefálica (**1**); veia cefálica mediana (**2**); veia basílica (**3**); veia basílica mediana (**4**); veia cubital mediana (**5**)

Geralmente, a punção venosa em pacientes geriátricos e pediátricos é difícil, sendo necessários, na maioria das vezes, agulhas de menor calibre e tubos de menor volume. As luvas descartáveis servem de proteção e são obrigatórias na sala de coleta, bem como o jaleco e o sapato fechado, fazendo parte dos equipamentos de proteção individual (EPI), descritos com mais detalhes no Capítulo 2, *Qualidade no Laboratório de Hematologia*.

O uso adequado do torniquete é muito importante. Isso porque talvez ocorra estase localizada, hemoconcentração e infiltração de sangue para os tecidos, caso sua aplicação exceda a 1min, podendo gerar valores falsos nos resultados de alguns exames.

TÉCNICAS PARA EVIDENCIAÇÃO DAS VEIAS

Após o braço estar em posição de coleta no apoiador, cabe procurar as veias calibrosas pedindo ao paciente para abrir e fechar a mão, já que os movimentos de abertura das mãos reduzem a pressão venosa, com o relaxamento muscular. Deve-se massagear suavemente do punho para o cotovelo o braço do paciente e, com o dedo indicador, diferenciar veias de artérias pela percepção da pulsação. A fixação das veias com os dedos é importante em casos de flacidez.

Outra técnica utilizada para evidenciação das veias é a transiluminação. Com um equipamento cutâneo é possível localizar veias, por meio de feixes de luz emitidos no interior do tecido subcutâneo do paciente, os quais podem iluminar as veias até 7mm de profundidade, facilitando sua localização. O equipamento não entra em contato com a pele do paciente, o que evita esterilização, sendo posicionado em média 25cm

acima do braço. Sua técnica de evidenciação de veia baseia-se na hemoglobina, que não reflete a luz infravermelha, marcando o local da veia.

O transiluminador utiliza uma ou duas fontes primárias de luz, a primeira, de alta intensidade (*laser*) e a segunda, infravermelha. Este equipamento tem maior utilidade em pacientes de difícil acesso venoso, como obesos, afrodescendentes, idosos e crianças, mas ainda é pouco utilizado (Figura 1.5).

PROCEDIMENTO DE COLETA A VÁCUO

Sempre antes do procedimento de coleta, convém conferir o nome completo do paciente com o nome impresso nos tubos e fazer a higienização das mãos. A coleta de sangue venoso para exames hematológicos laboratoriais deve ser feita a vácuo, de acordo com a norma regulamentadora NR32 da SBPC.

A coleta inicia-se com a preparação do material (ver Figura 1.3). Logo após garrotear o braço a 5cm acima do local escolhido para coleta, deve-se solicitar ao paciente para fechar a mão. O procedimento continua com a escolha da veia, apalpando-a com o dedo indicador. Depois, cabe fazer a assepsia, esperar secar e introduzir a agulha com dispositivo de segurança fixado ao adaptador. Coletam-se todos os tubos na mesma ocasião, solta-se o garrote e só depois retira-se a agulha. Para evitar hematomas, é muito importante fazer compressão com o algodão. Convém fazer a lâmina de preferência sem EDTA, para não alterar a morfologia celular, utilizando o sangue contido no interior da agulha, depois fechando-a com a trava e desprezando o material utilizado em dispositivos de segurança. Para finalizar, é fundamental trocar o algodão por uma bandagem séptica (Figura 1.6).

COLETA DE SANGUE VENOSO COM SERINGA E AGULHA

A coleta de sangue com seringa e agulha é a técnica mais antiga desenvolvida para extrair sangue venoso, sendo também a mesma usada para infundir medicamentos. Este procedimento oferece risco para o profissional de saúde, que, além de manusear o sangue, deve também descartá-lo. Isso pode causar ainda potenciais erros pré-analíticos.

"A punção venosa feita com seringa e agulha deve ser evitada por motivos de segurança". Essas são as normas do Manual do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) – antigo NCCLS –, um guia de padronização que teve os direitos autorais em português comprado pela Anvisa. Entretanto, na prática, ainda ocorrem casos de coleta de sangue com seringa e agulha, principalmente em pacientes pediátricos e geriátricos. Por isso, recomenda-se a utilização da trava de agulha e o dispositivo de descarte adequado (Figuras 1.7 e 1.8).

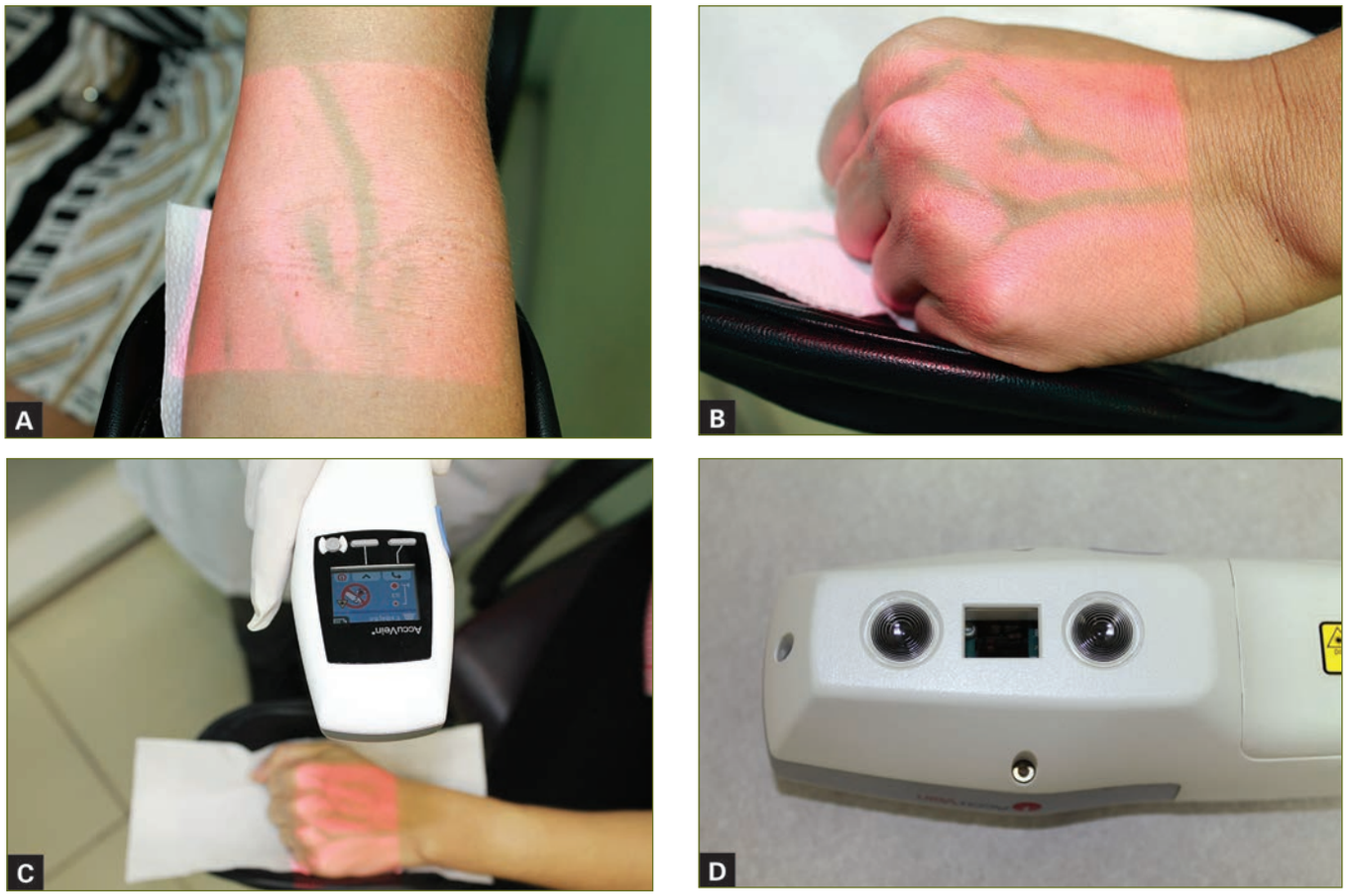


Figura 1.5 (**A** a **D**) Transiluminador. Utilizado na coleta para a evidenciação de veias, o equipamento usa uma ou duas fontes primárias de luz, a primeira, de alta intensidade (*laser*) e a segunda infravermelha. Pode iluminar as veias até 7mm de profundidade, o que facilita sua localização

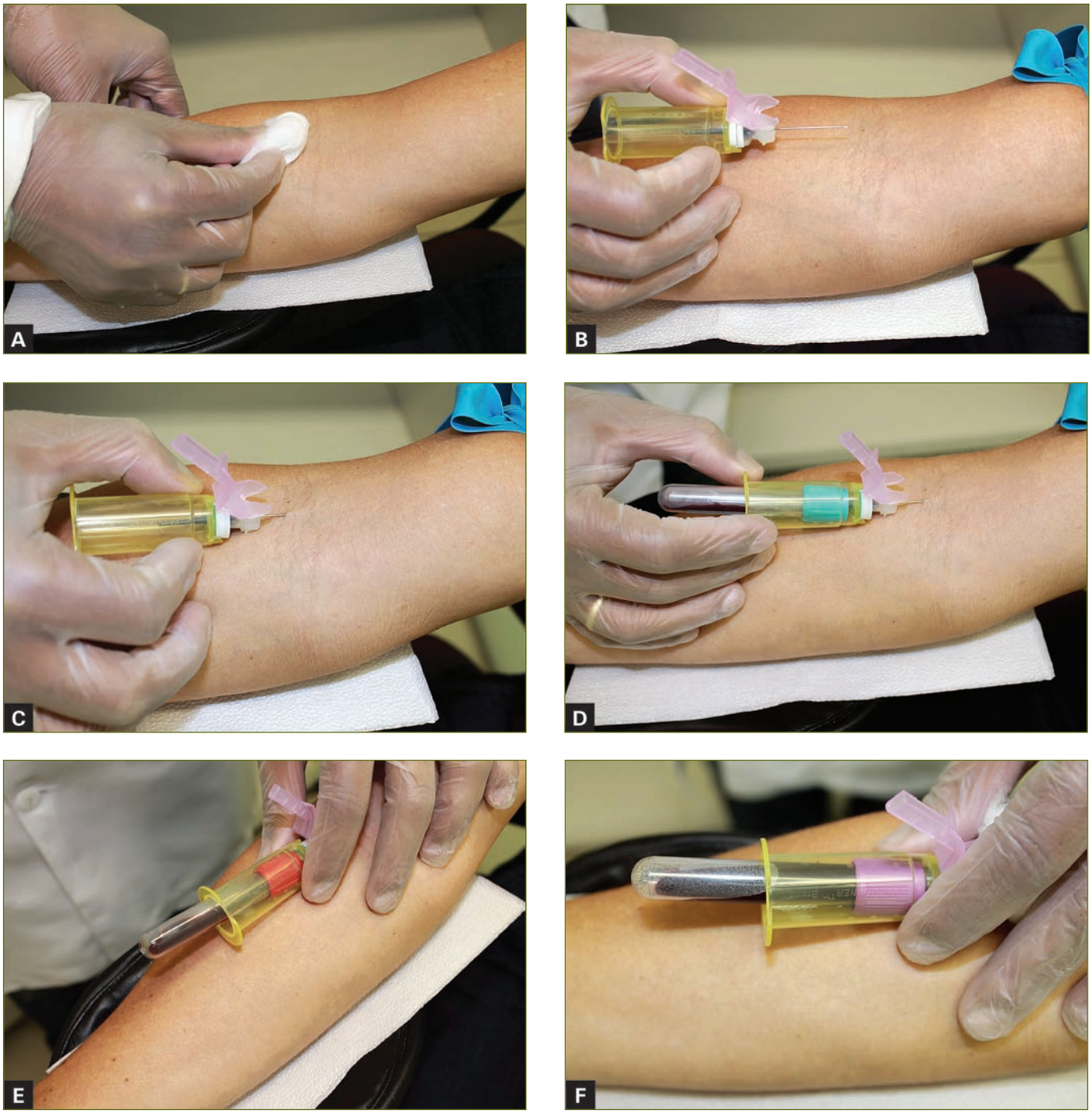


Figura 1.6 (**A** a **F**) Coleta de sangue venoso a vácuo

ESFREGAÇO SANGUÍNEO

No laboratório de hematologia, as lâminas utilizadas para fazer os esfregaços devem estar limpas e desengorduradas. Recomenda-se que o extensor seja um pouco mais estreito que a lâmina para produzir esfregaços mais adequados.

A padronização da confecção do esfregaço sanguíneo deve ser uma exigência do laboratório de hematologia. Isso porque esfregaços com falhas graves, espessos, finos demais, muito curtos, longos demais, sem cauda e confeccionados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) dificultam ou, em alguns casos, impossibilitam a liberação da contagem diferencial dos leucócitos. Assim, prejudica-se a realização de um hemograma confiável.

TÉCNICA DE CONFECÇÃO DO ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Coloca-se uma pequena gota de sangue sem EDTA em uma das extremidades da lâmina, cerca de 1 a 2cm do fim da lâmina. Com o extensor em um ângulo de 45 graus, faz-se contato

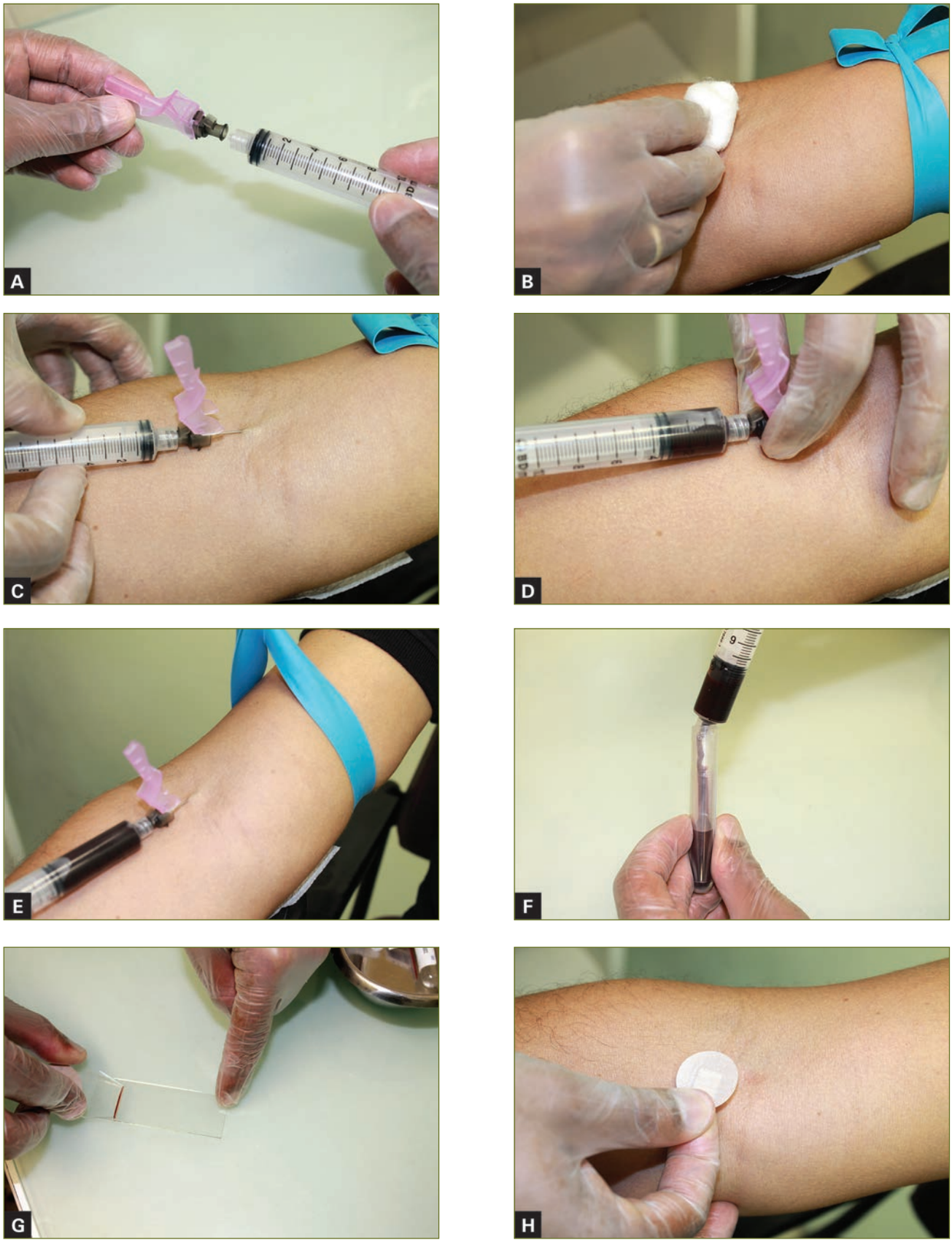


Figura 1.7 (**A** a **H**) Coleta de sangue venoso com seringa e agulha

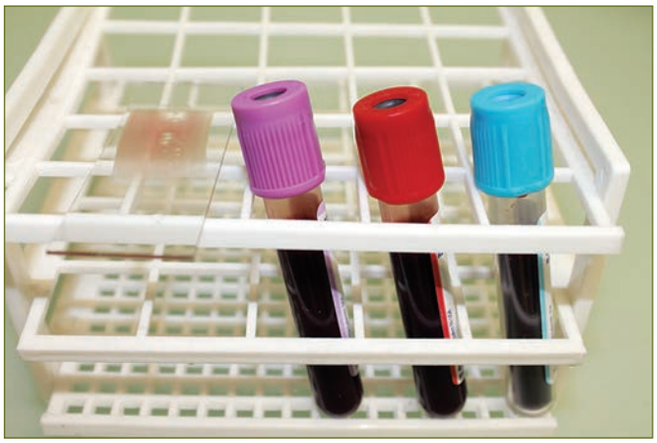


Figura 1.8 Material coletado para exames no setor de hematologia: esfregaço sanguíneo e tubos de coleta

com a lâmina e, com um ligeiro movimento para trás, toca-se no sangue e, em seguida, após o sangue se difundir no extensor, escorrega-se ele para a frente de uma vez, formando o esfregaço (Figura 1.9).

ESFREGAÇOS INADEQUADOS

Na Figura 1.10, são observadas seis formas inadequadas de confecção de esfregaços sanguíneos para o hemograma, dificultando ou impossibilitando a liberação da contagem diferencial dos leucócitos.

COLORAÇÃO

Todos os corantes hematológicos (Giensa, Wright, May Grunwald, Leishman) e os combinados (May Grunwald-Giemsa e Wright-Giemsa) se baseiam-se no corante de Romanowsky, cientista russo do século XI. Romanowsky desenvolveu uma mistura de corantes (eosina e azul de metileno) dissolvidos em álcool com o poder de identificar diferentes estruturas. Quando envelhecido, o corante fica bem melhor para a coloração dos esfregaços sanguíneos, pois o azul de metileno oxida e cria diferentes graduações de tons, evidenciando mais detalhes celulares.

TÉCNICA DE COLORAÇÃO MANUAL

Coloca-se a lâmina seca na estante de coloração e cobre-se com o corante hematológico, geralmente com o tempo médio de 1 a 3min. Acrescentam-se 20 gotas de água destilada tamponada, sem deixar transbordar, durante 5min em média. Depois, lava-se com água destilada tamponada e deixa-se secar na posição vertical (Figura 1.11).

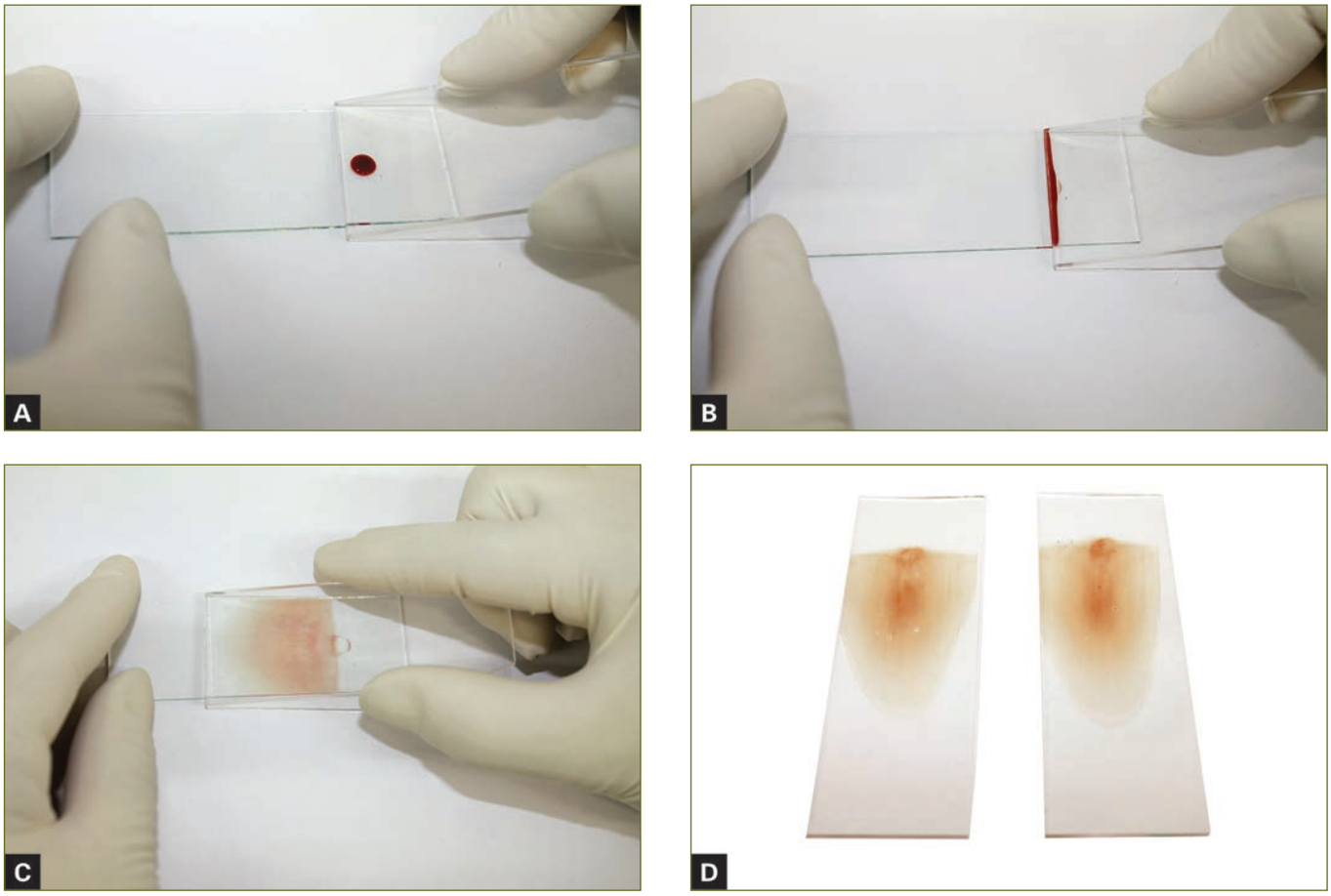


Figura 1.9 (**A** a **D**) Confecção do esfregaço

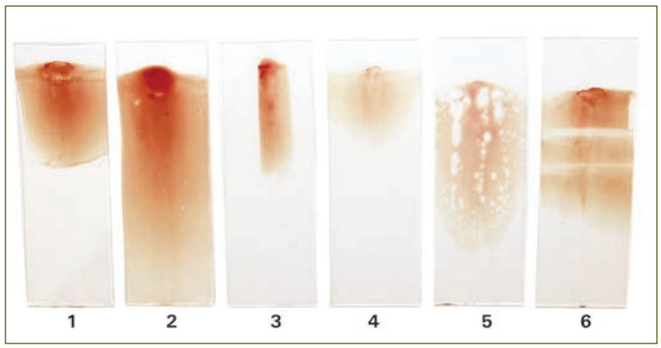


Figura 1.10 Esfregaços inadequados para coloração e conferência citológica: esfregaço grosso e curto (**1**); longo demais e sem cauda (**2**); muito fino (**3**); com pouco material (**4**); esfregaço em lâmina engordurada (**5**); e com pressão desigual produzindo falhas (**6**)

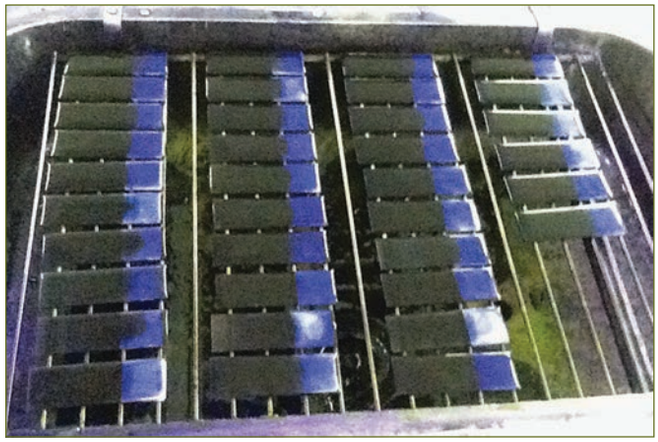


Figura 1.11 Coloração manual de lâminas

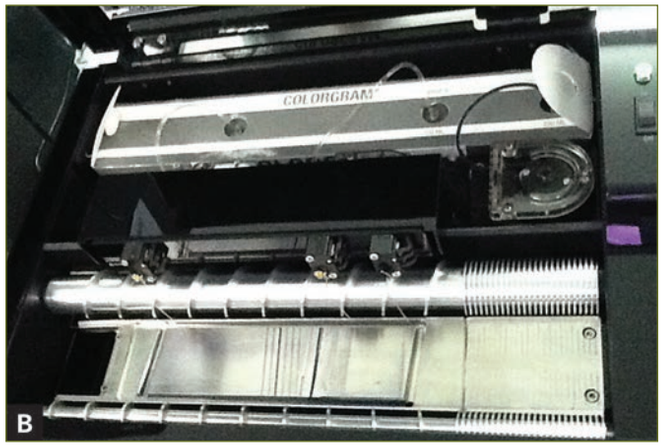


Figura 1.12 (**A** e **B**) Equipamentos automatizados de coloração de lâminas de hematologia

TÉCNICA DE COLORAÇÃO AUTOMATIZADA

Os equipamentos automatizados de coloração para hematologia podem ser acoplados aos contadores, corando as lâminas feitas pelo preparador automatizado das hematológicas (*slide-maker)*, ou isolados, sendo preenchidos manualmente por aquelas a serem tingidas. Geralmente, o equipamento usa a metodologia baseada na técnica manual de coloração. Contém um dispositivo aspiral que armazena 20 lâminas, leva em média 8min para corar uma lâmina e, em sequência, pode corar até 40 lâminas em 1h (Figura 1.12).

VARIAÇÃO NA COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS

Na Figura 1.13, são observados cinco esfregaços sanguíneos para o hemograma, apresentando uma evidente variação de coloração entre as diferentes graduações de tons. Quando inadequados, dificultam a identificação dos leucócitos.

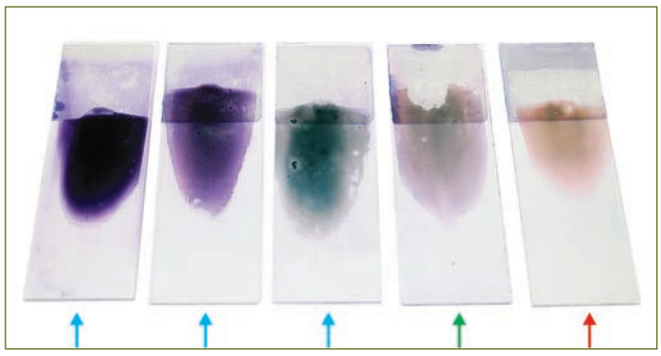


Figura 1.13 Esfregaços com captação excessiva de corante básico (*setas azuis*), esfregaço com coloração adequada (*seta verde*) e esfregaço ácido, com os componentes basofílicos pouco corados (*seta vermelha*)

Laboratorio de Hematologia - cap-01.indd 8 24/09/2014 10:19:50

2

Qualidade no Laboratório de Hematologia

HISTÓRICO DA QUALIDADE

A qualidade é condição fundamental nos laboratórios clínicos. Por isso, vem se tornando cada vez maior a exigência dos programas de acreditação e certificação da qualidade pelos órgãos governamentais e planos de saúde. Do mesmo modo, os avanços tecnológicos e a competição mercadológica contribuíram para a implantação da gestão da qualidade no laboratório clínico.

A primeira iniciativa interlaboratorial de controle de qualidade foi realizada nos EUA, em 1947, por Belk & Suderman. Eles utilizaram um *pool* de soro humano para comparar análises de um grupo de laboratórios. Em 1950, Levey & Jennings aprimoraram o controle interno já praticado na época, por meio da representação gráfica dos valores diários. Essas atividades foram denominadas "programas de controle de qualidade", as quais atualmente envolvem aquelas relacionadas com os controles externo e interno da qualidade.

A evolução da regulamentação nos EUA, a partir da década de 1960, iniciou-se com o Clinical Laboratory Improvement (CLIA'67), Lei Federal norte-americana atualizada em 1988 (CLIA'88). Os esforços iniciais para a formação do National Commitee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que visavam a definir padrões ou diretrizes, iniciaram-se em 1966, simultaneamente ao CLIA'67. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), do Ministério da Saúde, edita as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC), regulamentando aspectos específicos para laboratórios, como a RDC nº 302/2005, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos.

Em nosso país, algumas normas para a avaliação e o reconhecimento de competências técnicas surgiram nos anos 1990. Hoje em dia, existem diversas normas aplicáveis a laboratórios clínicos, tanto utilizadas para certificação, como ISO 9001:2008, quanto para fins de acreditação. Para a acreditação, há o *Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC)* da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (SBPC/ML), o *Sistema Nacional de Acreditação* da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC) e o *Manual de Acreditação Hospitalar* da Organização Nacional de Acreditação (ONA). Internacionalmente, destacam-se o College of American Pathologistis (CAP) e o *ISO 15189 Medical Laboratories – Particular Requeriments for Quality and Competence*.

QUALIDADE EM HEMATOLOGIA

A garantia da qualidade corresponde ao conjunto de atividades planejadas e sistemáticas que assegura os processos de acordo com determinados pré-requisitos. Um programa de qualidade no laboratório de hematologia visa a ações reais, a fim de aumentar a probabilidade de se obter resultados adequados e confiáveis.

O hemograma tem notável importância para o diagnóstico e o controle evolutivo das doenças infecciosas, crônicas e agudas e no acompanhamento de tratamentos (quimioterapia, radioterapia), pois por meio desse exame podemos analisar as variações quantitativas e morfológicas das séries sanguíneas. Assim, a automação do hemograma tem proporcionado um aumento na eficácia e na confiabilidade dos resultados emitidos pelos laboratórios de hematologia. No entanto, devem ser constantes a manutenção e a monitoração dos equipamentos e o uso de controles estáveis e padronizados na rotina laboratorial. A garantia da qualidade em hematologia tem como objetivo assegurar a confiabilidade dos testes hematológicos em todas as fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

O programa de qualidade deve abranger desde a preparação do paciente para coleta até a liberação dos resultados dos exames. Dessa maneira, a garantia da qualidade no laboratório clínico é essencial. Isso porque os resultados laboratoriais influenciam aproximadamente 60% a 70% das decisões médicas e, portanto, podem afetar o diagnóstico e o tratamento do paciente.

FASE PRÉ-ANALÍTICA

A fase pré-analítica é o período entre a solicitação do clínico até a realização do exame e envolve a requisição do exame, ou seja, compreende todos os processos anteriores à amostra ser processada pelo equipamento e analisada pelo citologista. A orientação sobre a coleta, a preparação e a coleta do material, o cadastramento e o transporte até o laboratório clínico são exemplos desta fase.

Publicações recentes indicam que a fase pré-analítica é responsável por 46% a 68% dos erros laboratoriais. Um erro na fase pré-analítica influencia decisivamente no erro total e, consequentemente, no resultado analítico que o laboratório for liberar para o paciente. Desse modo, uma adequada realização da fase pré-analítica pode evitar a repetição do exame e da coleta, além de um diagnóstico incorreto que conduza a um tratamento inadequado.

Os exemplos de erros mais comuns na fase pré-analítica são: o preenchimento inadequado do pedido, a troca da etiqueta com a identificação do paciente no tubo e/ou lâmina, o uso excessivo no tempo do torniquete, a coleta difícil e lenta (geralmente coleta pediátrica), o volume do sangue inadequado, a lâmina mal confeccionada e com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a ordem incorreta dos tubos de coleta, a homogeneização insuficiente do tubo, o tempo prolongado entre a coleta e a realização do exame e a temperatura inadequada de armazenamento e transporte da amostra. Para tentar diminuir os erros totais, o laboratório deve priorizar a fase pré-analítica, desenvolvendo procedimentos próprios com base nas normas de acreditação e certificação da qualidade.

COLETA E CADASTRO DO PACIENTE

Os procedimentos de cadastro e coleta do paciente devem garantir a qualidade analítica da amostra biológica para o hemograma. A compreensão da requisição médica auxilia no sucesso da coleta. Dados importantes como gênero, idade, posição do corpo, atividade física, jejum, dieta, uso de medicação, tabagismo, etilismo e condições cronobiológicas devem ser fornecidos pelo paciente.

Algumas medidas podem ser tomadas para a implantação da melhora da qualidade na fase pré-analítica e estão diretamente ligadas à excelência do hemograma, como:

- Realização de treinamentos periódicos dos recepcionistas e coletadores.
- Padronização dos procedimentos da coleta da amostra.
- Materiais de coleta, como suportes para agulhas e agulhas de diferentes calibres, podem ser selecionados de acordo com a veia do paciente.
- Pode-se usar seringa para a coleta do sangue venoso para o hemograma; a preferência é pela coleta a vácuo e pelos sistemas fechados e seguros.
- Após a coleta, homogeneizar lentamente, de 8 a 10 vezes, o tubo por inversão para não hemolisar, evitando a formação de microcoágulos que interferem na contagem de plaquetas.
- Confeccionar o esfregaço sem o EDTA no momento da coleta para evitar a alteração morfológica das células, apesar de alguns laboratórios confeccionarem o esfregaço sanguíneo no setor com EDTA, por meio de aparelhos automatizados (*slide-makers*). Estes confeccionam e coram os esfregaços sanguíneos.

Após o advento da NR32, que preconiza a utilização da trava de segurança para as agulhas, desenvolvemos em nosso laboratório uma técnica para a confecção do esfregaço sem o EDTA. Ela consiste na utilização de um tubo seco, sem vácuo e tampado no momento da coleta, colocado no suporte da agulha, após o último tubo, para empurrar o sangue contido nesta antes de travá-la com o dispositivo de segurança.

TRANSPORTE DA AMOSTRA

O transporte da amostra é também um fator muito importante, o qual interfere diretamente na qualidade da amostra. A amostra deve ser transportada entre 18°C a 25°C, na posição vertical, em recipiente isotérmico, higienizável, impermeável, e chegar ao local para análise no máximo em quatro horas após a coleta. Isso garante a estabilidade desde a coleta até a realização do exame. O recipiente deve ser identificado com a simbologia de risco biológico com a frase "Espécimes para diagnóstico" (Figura 2.1).

ACEITAÇÃO E REJEIÇÃO DA AMOSTRA

Os critérios de aceitação e rejeição da amostra no laboratório de hematologia também fazem parte da fase pré-analítica e devem envolver a:

- **Aceitação da amostra**:
  - A amostra deve chegar ao setor de hematologia identificada com a etiqueta de código de barras, em tubo plástico contendo EDTA K2 (recomendado pelo International Council for Standardization in Haematology [ICSH]), transportada para a unidade de análise em caixas térmicas até quatro horas após a coleta do sangue.
- **Rejeição da amostra**:
  - Amostra sem identificação, com identificação errada ou duvidosa; amostra inadequada de acordo com o grau de lipemia e hemólise; amostra com volume insuficiente e transportada de modo inadequado.

Embora as tecnologias de automação auxiliem na resolução de problemas relacionados com a amostra, como sensores de coágulo e leitura para lipemia ou hemólise, estes ainda são causas comuns de rejeição da amostra na hematologia. Além de afetar os parâmetros do hemograma com diminuição da contagem de leucócitos, plaquetas e hemácias, a existência

Figura 2.1 (**A** e **B**) Transporte. Bolsa térmica contendo células de gelo, estantes com amostras e o símbolo de material infectante (**A**) e medição da temperatura na bolsa por meio de termômetro com leitor óptico (**B**)

de coágulo prejudica o equipamento causando obstrução no sistema. Já a existência de lipemia no sangue interfere na dosagem de hemoglobina, fornecendo resultados de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) falsamente aumentados.

Por sua vez, a hemólise intensa também pode elevar a dosagem de hemoglobina e reduzir o número de hemácias com consequente CHCM aumentado. Os anticorpos frios ou crioaglutininas causam agregação nas hemácias quando a temperatura da amostra é inferior a 37°C. Assim, os equipamentos contam os grumos de hemácias inadequadamente, diminuindo a contagem total de hemácias e aumentando falsamente o volume corpuscular médio (VCM) e a CHCM (Figura 2.2).

FASE ANALÍTICA

A fase analítica corresponde à da realização da análise propriamente dita. Integram esta fase a manutenção dos equipamentos, a calibração, a validação, o controle de qualidade, a preparação e a análise da amostra.

A confiabilidade dos resultados do laboratório é garantida pela realização do controle de qualidade, que tem como funções básicas a análise, a pesquisa e a prevenção de ocorrência de erros laboratoriais por meio de programas que incluem tanto o controle interno quanto o controle externo. Para implantarmos um programa de qualidade da fase analítica em hematologia, com o objetivo de monitorar a estabilidade do

Figura 2.2 (**A** a **C**) Aceitação e rejeição da amostra – sangue com hemólise (*seta*) (**A**); sangue lipêmico (**B**); sangue com aglutinação provocada por anticorpo frio (**C**)

processo ao longo do tempo, identificar constantemente os erros e realizar as ações corretivas necessárias, é importante elaborar os procedimentos operacionais padronizados (POP), validar os processos, calibrar os equipamentos, programar e fazer as manutenções dos equipamentos. Do mesmo modo, convém definir o plano de contingência, capacitar os profissionais por meio de educação continuada e monitorar e registrar diariamente todo o processo.

A gestão da fase analítica inclui a monitoração do sistema automatizado. Este gerenciamento envolve várias etapas, começando pelo inventário dos equipamentos e prosseguindo com as inspeções periódicas e a instalação, desde a solicitação do serviço para manutenção até o retorno do equipamento à operação.

Uma gestão de documentos deve ser implementada para controlar e atualizar, sempre que necessário, aqueles utilizados como consulta na realização dos exames, como: os POP; os manuais de operação dos equipamentos; as orientações dos fornecedores (bulas) para elaboração dos procedimentos e os respectivos registros; a monitoração do plano de manutenções preventivas; a verificação e o registro de eventuais manutenções corretivas; o controle da validação; e a calibração dos equipamentos.

Definir alguns termos é fundamental para a compreensão do controle de qualidade:

- **Média aritmética**: é a medida de tendência central mais comum para um conjunto de dados. É obtida por meio da divisão entre a soma dos dados pela quantidade deles.
- **Desvio padrão (DP)**: é a medida absoluta da dispersão ao redor do valor-alvo e está relacionado com a média obtida comparada ao grupo (média esperada).
- **Coeficiente de variação (CV)**: é a medida da variabilidade da precisão do equipamento e da estabilidade do controle expressa em porcentagem. É obtido pela divisão entre o DP e a média aritmética dos dados.
- **Exatidão**: corresponde à capacidade do método em apresentar resultados próximos do valor verdadeiro. Segundo a International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), a exatidão é a concordância entre o valor medido de um analito e seu valor real (Figura 2.3).
- **Precisão**: o documento da CLSI EP5-A231 define a precisão como uma concordância entre resultados de medidas independentes obtidos sob condições estipuladas. A precisão revela a capacidade de o método, em determinações repetidas em uma mesma amostra, fornecer resultados próximos entre si.
- **Reprodutibilidade**: corresponde à concordância entre resultados do mesmo analito, realizado sob condições de medidas alteradas.
- **Repetibilidade**: corresponde à concordância entre resultados de sucessivas medidas do mesmo analito, sendo realizado sob as mesmas condições de medida.
- **Erros aleatórios**: são chamados de erros randômicos, difíceis de serem identificados, pois ocorrem ao acaso. Correspondem a resultados que se afastam do valor esperado e estão relacionados com a imprecisão.

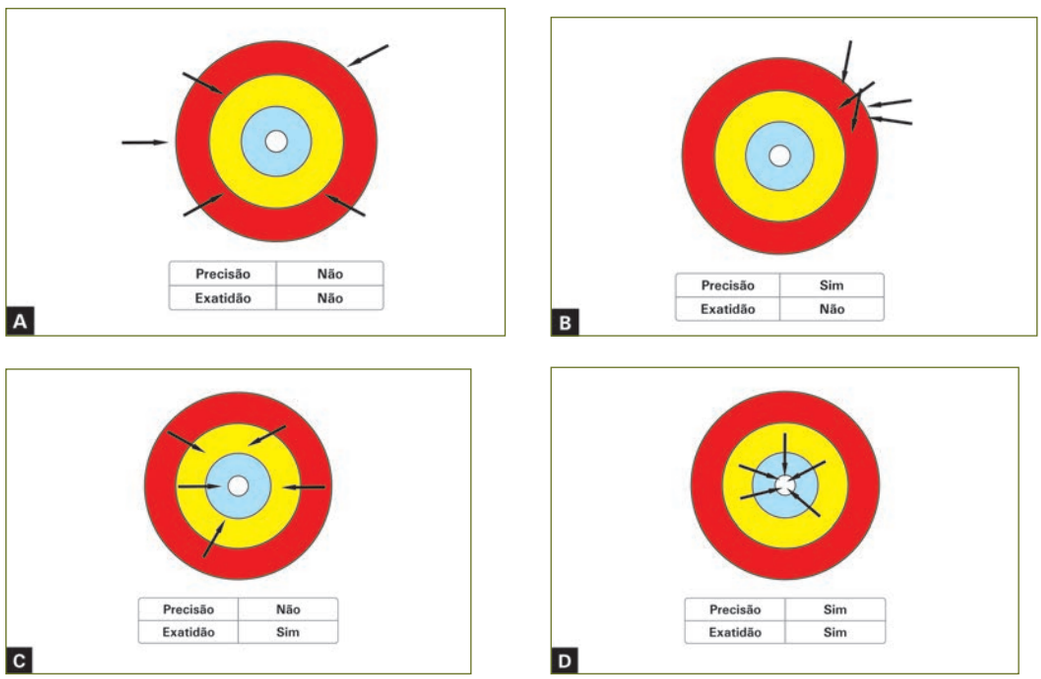


Figura 2.3 (**A** a **D**) As setas não acertam o alvo e não ficaram próximas entre si (**A**). As setas não acertam o alvo, mas ficam próximas entre si (**B**). As setas acertam o alvo, mas ficam longe entre si (**C**). As setas acertam o alvo e ficam próximas entre si (**D**)

- **Erros sistemáticos**: ocorrem de maneira regular e constante, resultando na perda de exatidão.
- **Erro total**: é o somatório do erro sistemático com o erro aleatório.

VALIDAÇÃO E CALIBRAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

A validação do desempenho de um processo e sua aprovação para a utilização na rotina consiste em avaliar seu nível de erros frente a uma determinada especificação de qualidade. Em hematologia, a validação dos analisadores hematológicos deve ocorrer na sua implantação. Esses equipamentos têm particularidades inerentes ao processo de realização do hemograma que diferem dos equipamentos de outras áreas do laboratório. Geralmente, têm um modo fechado (mais usado) e o modo aberto (usado em alguns tipos de tubo pediátrico e urgências). Liberam diversos alarmes eletrônicos (*flags*) quando identificam leucócitos, hemácias e plaquetas. Sua completa validação implica menor número de lâminas para revisão na microscopia e aumento dos resultados com valor diagnóstico. A validação do analisador deve envolver o estudo de precisão intra- e interensaio, a precisão entre sistemas analíticos, o estudo de exatidão, o estudo de linearidade, o estudo de robustez, o estudo de estabilidade de amostra e o estudo de interferentes.

A calibração dos equipamentos é outra questão importante na gestão da fase analítica. A verificação da calibração pode ser realizada a qualquer momento para confirmar as condições de exatidão do sistema analítico. Recomenda-se sua realização periódica (semestralmente) e, especialmente, quando houver alteração no sistema analítico (manutenção do equipamento).

A calibração corresponde a um conjunto de operações que estabelecem a relação quantitativa entre a resposta de um sistema analítico e os valores de concentração ou atividade de um ensaio. Decorrem desse conceito a sensibilidade analítica do método, o limite de detecção, seu limite de quantificação e a linearidade.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

O POP é um documento que descreve de modo detalhado as operações necessárias para a realização de uma atividade técnica. Considerado uma ferramenta importante para a gestão da qualidade, o POP tem como objetivo padronizar e garantir os processos para alcançar os resultados esperados a cada tarefa executada nas etapas do programa de qualidade.

Os itens que fazem parte do POP são:

- **Título**: informar o nome do teste, o material (soro, plasma), a marca do reagente/equipamento.
- **Finalidade do método**: descrever a indicação médica a que se aplica o exame (o diagnóstico, a monitoração de uma terapêutica ou o prognóstico de uma doença).
- **Princípio do método**: descrever o princípio do método aplicado nas reações, como a reação química.
- **Especificação de desempenho**: fazer referência aos limites de sensibilidade, especificidade, linearidade, imprecisão, exatidão e erro total.
- **Amostra**: descrever o tipo de amostra, o recipiente, o aditivo e o volume mínimo a ser coletado. Descrever estabilidade e armazenamento.
- **Materiais requeridos**: listar os equipamentos (principais e auxiliares) e materiais necessários para a execução do exame.
- **Reagentes**: listar os reagentes que serão utilizados, assim como seu preparo, se aplicável.
- **Controle de qualidade**: descrever o controle de qualidade interno e externo. Descrever o manuseio, a frequência de utilização e o armazenamento dos materiais de controle ou fazer referência a documento específico.
- **Procedimento de calibração**: descrever o processo de calibração/verificação, garantindo que as medições realizadas sejam rastreáveis a padrões nacionais e internacionais de medida, quando disponíveis ou fazer referência a documento específico.
- **Procedimento técnico**: incluir os passos do procedimento de maneira detalhada. Descrever a rotina para realização da atividade, detalhando passo a passo a execução do processo.
- **Fontes potenciais de variabilidade**: ações e processos que interferem nos resultados analíticos. Descrever as possíveis variações que possam ocorrer no resultado dos exames decorrentes de falhas nos processos pré-analítico (aplicação do torniquete, tempo de transporte, homogeneização) e analítico (calibração, manutenção dos equipamentos).
- **Cálculos e liberação dos resultados**: descrever a fórmula ou as formas de cálculos necessários, se aplicáveis, para a expressão dos resultados.
- **Intervalo de referência**: indicar valores de referência do exame.
- **Intervalo reportável**: descrever o intervalo de valores do analito que um método pode liberar como um resultado quantitativo, possibilitando a diluição de amostras, a concentração ou outro pré-tratamento.
- **Valor crítico**: definir os limites que, do ponto de vista da saúde, podem constituir risco à vida do paciente e o processo de notificação ao médico e/ou paciente.
- **Interferências e possíveis causas de resultados positivos e negativos**: interferentes *in vivo* que talvez interfiram nos resultados dos exames.
- **Precauções de segurança**: citar os equipamentos de proteção individual (EPI) necessários para a execução da tarefa.
- **Interpretação clínica dos resultados**: tecer comentários interpretativos relacionados com o exame.
- **Anexos**: incluir informações complementares para execução do exame, como gráficos, fluxogramas, ilustrações etc.
- **Bibliografia**: fazer referência ao material bibliográfico utilizado para estabelecer a metodologia de execução do exame.
- **Quadro de registros**: listar os registros da qualidade que comprovem a execução do exame.
- **Natureza das alterações**: todas as alterações devem ser relacionadas. Listar as alterações nas revisões do procedimento.
- **Elaborado/revisado/aprovado**: citar os responsáveis pela elaboração, revisão e aprovação dos procedimentos.

CONTROLES INTERNO E EXTERNO DA QUALIDADE

Controle interno

No controle de qualidade dos equipamentos, inicialmente, convém definir o controle interno a ser utilizado. Atualmente, a melhor opção é a utilização de controles comerciais, conforme determina a Anvisa na resolução RDC nº 302/2005 para funcionamento de laboratórios clínicos. O regulamento deixa claro que, para todas as análises, devem ser estabelecidos controles internos e externos da qualidade e que cabe ao laboratório buscar controles comerciais padronizados. Essa mesma resolução permite que, na indisponibilidade de controles comerciais adequados, sejam adotadas formas alternativas de controle que possibilitem avaliar a precisão da análise.

O controle interno da qualidade (CIQ) tem a finalidade de verificar a calibração dos sistemas analíticos e garantir a reprodutibilidade (precisão) dos resultados, além de indicar a necessidade de ações corretivas. A análise laboratorial está sujeita à imprecisão (variação, erro aleatório) e à inexatidão (desvio, viés, erro sistemático). Esses são os fatores do erro total, que pertencem ao processo de medição e os quais se deseja manter o mais próximo de zero para ter resultados confiáveis e seguros.

Em hematologia, é importante utilizar diariamente o controle interno comercial nos três níveis (alto, normal e baixo), antes do início da rotina. Além disso, convém monitorar o coeficiente de variação, a média e o DP utilizando o gráfico de Levey-Jennings. O controle comercial detecta desvios e erros sistemáticos e aleatórios; e controla a contagem diferencial. Cabe utilizar um valor-alvo obtido no laboratório, em vez dos valores do fabricante (*ranger* da bula). O algoritmo de Bull e o Delta Check são comumente usados quando vêm implantados em analisadores hematológicos ou via sistema informatizado do laboratório.

O algoritmo de Bull, conhecido como média móvel e controle Xbar, trata-se de uma ferramenta disponível nos analisadores mais modernos para auxiliar no monitoramento da rotina. Consiste no cálculo da média dos resultados da rotina a cada 20 pacientes para os parâmetros hematológicos. As médias calculadas são incorporadas ao gráfico de médias (Xbar) para a comparação com as médias anteriores. Essa ferramenta é útil para detectar problemas nos reativos e amostras (qualidade e coleta), característicos da "população" do laboratório, e detectar variações na rotina.

O Delta Check possibilita a comparação de resultados de um mesmo paciente realizados no mesmo dia ou em dias sucessivos para detectar erros intrínsecos e extrínsecos do laboratório, principalmente os aleatórios, a partir da análise de consistência dos resultados dos hemogramas.

Outra forma de controle na hematologia utilizada para verificar a estabilidade do equipamento ao longo do dia é a repetição de amostras da rotina. Após passar o controle interno comercial, deve-se avaliá-lo estatisticamente, selecionar uma amostra, passar no início da rotina e, a cada 100 pacientes analisados, passar novamente a amostra conhecida. É importante que ela esteja refrigerada (4°C a 8°C). Se houver dois ou mais equipamentos, passar a amostra nos equipamentos e calcular a média, o DP e o coeficiente de cada parâmetro Espera-se que um sistema sob controle não apresente elevação superior a 5% e que sistemas robustos não ultrapassem 2% na maioria dos parâmetros.

De acordo com o CLIA'88, a variação aceita entre equipamentos enquadra-se nos seguintes parâmetros:

- **Leucócitos**: +/– 5,0%.
- **Hemácias**: +/–2,5%.
- **Hemoglobina**: +/–2,0%.
- **Hematócrito**: +/–2,5%.
- **Volume corpuscular médio**: +/–2,5%.
- **Plaquetas**: +/– 7,0%.

É importante planejar os critérios de análise, como limites e regras de controle, e definir o momento da análise, a frequência e a sistemática de registro. Os limites de controle correspondem à faixa de aceitação para verificar se um procedimento de medição está dentro ou fora do controle. Esses limites são calculados por meio da média e do DP. As regras de controle utilizam uma combinação de critérios de decisão para julgar se uma corrida está dentro ou fora do controle.

Os gráficos de controle são úteis para melhor visualização do comportamento do controle e ajudam a detectar o tipo de erro presente, além de avaliar os dados ao longo do tempo. Nos laboratórios clínicos, são mais utilizados, por oferecerem modos melhores de rejeição e aceitabilidade de uma corrida, possibilitando ainda a análise de todos os níveis simultaneamente. São também mais difundidos por estarem incluídos em *softwares* de vários equipamentos.

Regras de Westegard

O controle de qualidade de regras múltiplas de Westegard, como é mais conhecido, utiliza regras de controles diferentes para julgar a aceitabilidade de uma corrida analítica. Geralmente, as regras de Westegard são utilizadas com duas ou quatro medições de controle a cada corrida. Isso significa que elas são apropriadas quando dois materiais de controle diferentes são medidos uma ou duas vezes por material – caso de muitas aplicações bioquímicas. Algumas regras de controle alternativas são mais apropriadas quando se analisam três materiais de controle, o que é comum para aplicações em hematologia.

As análises com base nas regras múltiplas trazem alguns benefícios, como análise simples de gráficos, possibilidade de ação imediata, fácil integração e adaptação à rotina e melhor capacidade de identificação de erros e indicação do tipo de erro. As regras mais comuns definidas por Westgard são (Figuras 2.4 a 2.7):

Gráfico de Levey-Jennings

O gráfico de Levey-Jennings aplica-se a dados com comportamento gaussiano, no qual a linha central corresponde à média e as linhas adjacentes relacionam com os múltiplos de DP (Figura 2.8). É utilizado para relatar os valores diariamente ou por meio de corrida em um gráfico contendo limites de +/–1DP, +/–2DP, +/–3DP em torno da média, desse modo liberando o equipamento para a rotina dos exames. Os limites de decisão

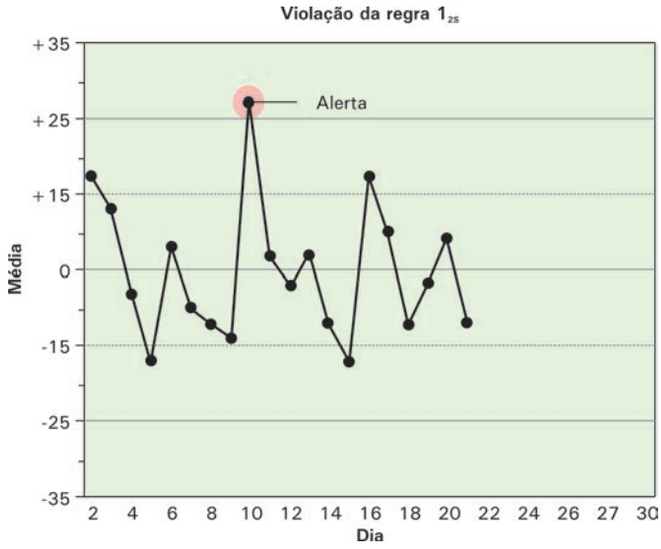


Figura 2.4 Regra 1_{2s}. Esta regra de controle é comumente utilizada com um gráfico de Levey-Jennings quando os limites de controle calculados são (Média +/–2DP). Usa-se como regra de alerta para acionar uma investigação dos dados de controle quando aplicada em mais de um nível

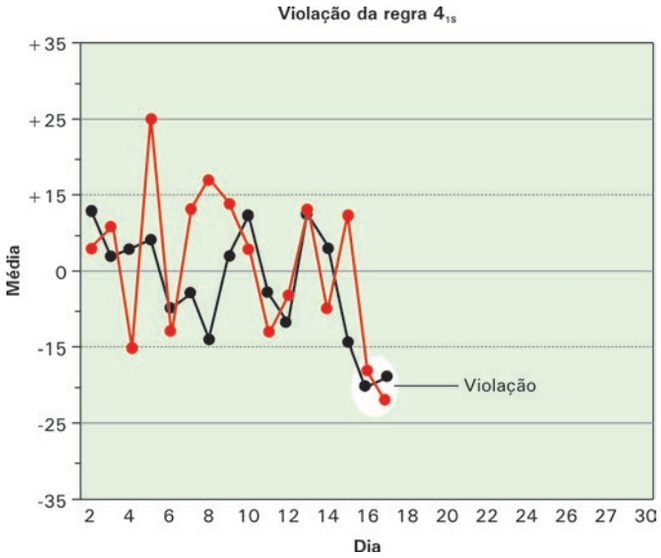


Figura 2.6 Regra 4_{1s}. Regra para a qual se rejeita a corrida de quatro medições consecutivas que excedem o mesmo nível de controle (Média +/–1DP) ou (Média –1DP)

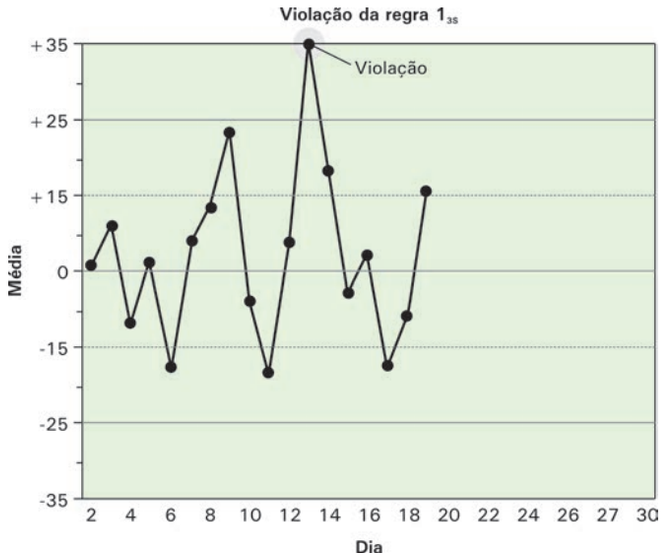


Figura 2.5 Regra 1_{3s}. Regra de controle no qual os limites calculados são (+/–3DP). A corrida é rejeitada quando uma única medição de controle excede um dos limites

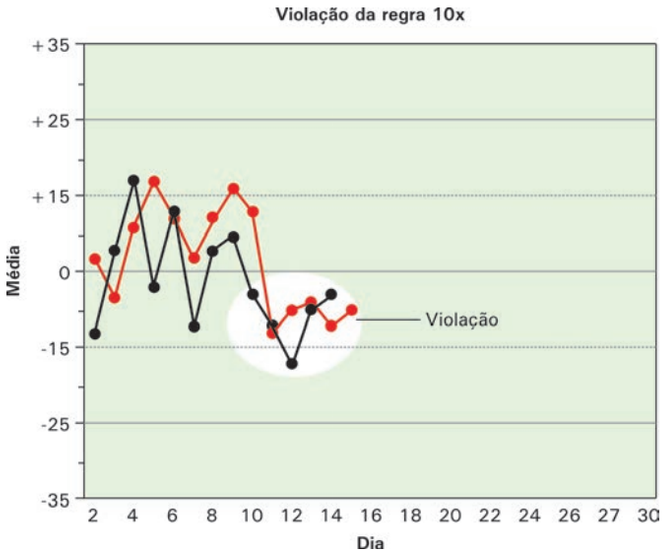


Figura 2.7 Regra 10_x. Regra para a qual se rejeita a corrida quando 10 medições de controles consecutivas estiverem no mesmo lado em relação à média. Indica erro sistemático

e as regras para liberação baseiam-se em probabilidades estatísticas. Assim, quando o equipamento estiver liberando resultados confiáveis, ou sob controle, cerca de 68,3% dos resultados localizam-se dentro +/–1DP da média, aproximadamente 95,5% dos resultados ficam +/–2DP da média e cerca de 99,7% dos resultados localizam-se dentro de +/–3DP da média. Geralmente, aceita-se a corrida quando o resultado localiza-se até +/–2DP.

Na análise do gráfico de Levey-Jennings (Figuras 2.9 a 2.11), identificamos o tipo de erro que pode ocorrer. Erros aleatórios podem estar relacionados com: bolhas nas seringas dos equipamentos, nas amostras ou nos reagentes; existência de coágulos nas amostras ou na agulha do equipamento; e oscilações da corrente elétrica. Erros sistemáticos podem estar ligados a: nova calibração, mudança de lote de reagentes, mudança do operador com treinamento insuficiente, deterioração de reagentes, controles e calibradores deteriorados ou vencidos, temperatura inadequada de armazenamento de reagentes e deterioração da lâmpada do equipamento.

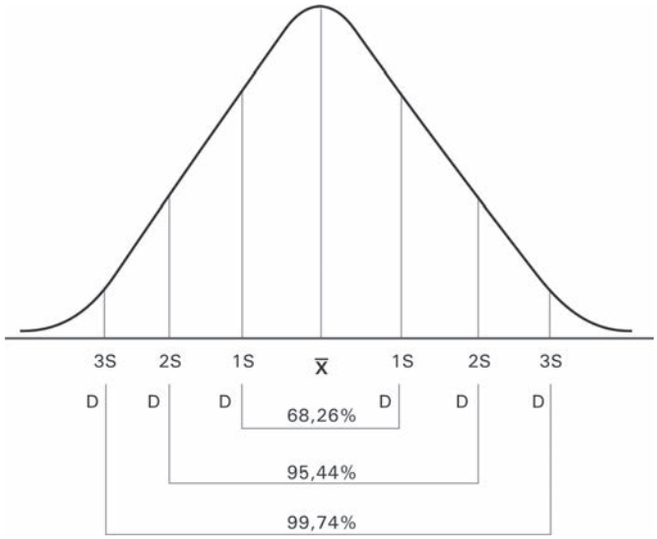


Figura 2.8 Gráfico de Levey-Jennings

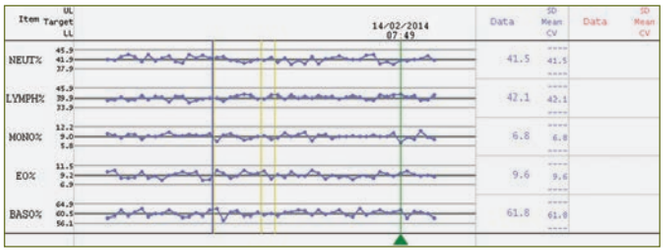


Figura 2.9 Controle comercial. Gráfico de Levey-Jennings apresentando todos os parâmetros sob controle, ou seja, em torno da média

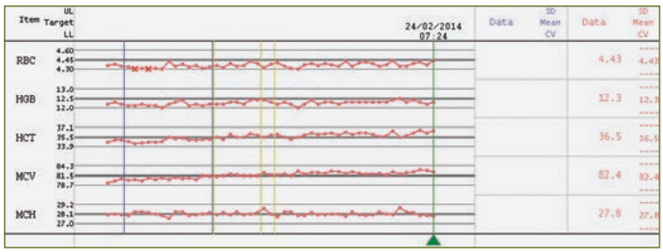


Figura 2.10 Controle comercial. Gráfico de Levey-Jennings apresentando os valores dos resultados da hemácia e da hemoglobina abaixo da média

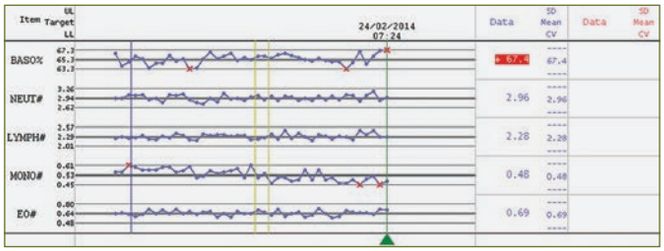


Figura 2.11 Controle comercial. Gráfico de Levey-Jennings apresentando os valores dos resultados do basófilo abaixo da média e, em seguida, com tendência acima da média. Nos monócitos, apresenta valores dos resultados abaixo da média

Microscopia

O microscópio é um instrumento fundamental para a qualidade da análise da amostra na hematologia. Problemas com esse equipamento podem induzir o citologista ao erro durante a análise. Para garantir uma boa capacidade de funcionamento e diminuições de quebras, é preciso realizar manutenções preventivas com ações realizadas pelo próprio citologista e também por um técnico especializado. Diariamente, convém limpar as lentes objetivas e oculares com álcool a isopropílico, bem como a plataforma de lâminas, do condensador e das demais partes do microscópio. Nas lentes objetivas, após o uso de imersão, deve-se retirar o excesso de óleo com lenço de papel e finalizar a limpeza com um cotonete levemente umedecido de éter. Mensalmente, deve-se verificar a iluminação e a centralização do foco e, semestralmente, realizar com o técnico especializado a manutenção preventiva mais detalhada (Figura 2.12).

A padronização em microscopia no laboratório de hematologia é uma ação importante na garantia da qualidade. Nesta, consideram-se duas características: avaliar as estruturas, que trata da exatidão, e analisar a reprodutibilidade, que trata da precisão. Dessa maneira, são importantes os treinamentos teóricos e práticos, assim como a discussão de casos hematológicos e a realização dos controles interno e externo (ensaio de proficiência) entre os citologistas.

Homogeneização

Algo que facilita a qualidade no setor de hematologia, principalmente em laboratórios com vários postos de coleta (alguns distantes da unidade de análise) é a utilização de homogeneizadores automáticos antes de passar a amostra no equipamento (Figura 2.13). Observou-se que alguns analisadores hematológicos não têm uma homogeneização satisfatória e que este fato interfere, principalmente, nos parâmetros da série vermelha.

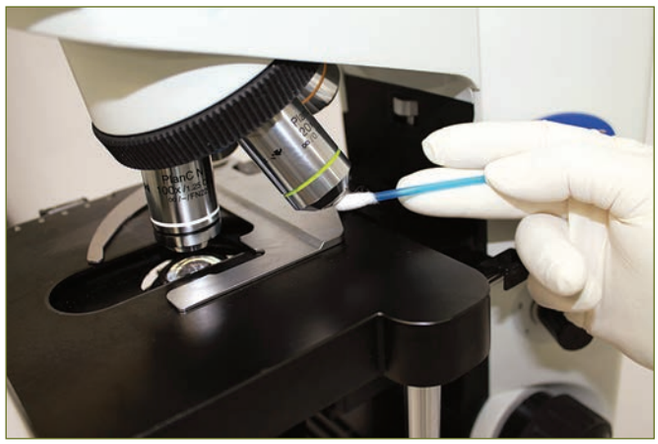


Figura 2.12 Limpeza do microscópio. Com isopropílico ou éter, deve-se limpar as objetivas e oculares, bem como a plataforma de lâminas, o condensador e as demais partes do microscópio

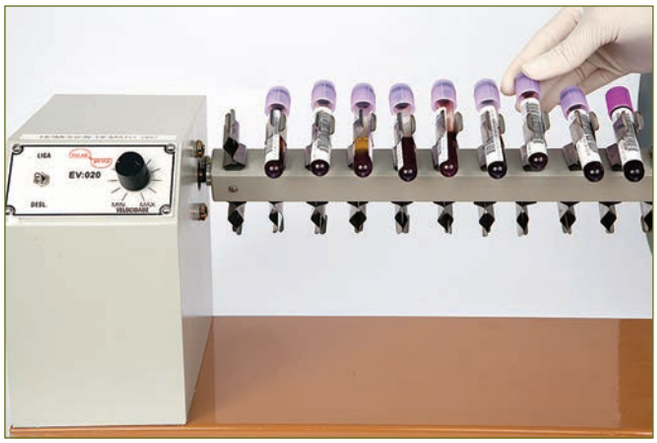


Figura 2.13 Homogeneizador automático: utilizado antes das amostras serem processadas no equipamento

Controle externo (ensaio de proficiência)

Os controles externo e interno têm funções complementares na qualidade do laboratório. Juntos, têm o objetivo de identificar a existência de plausíveis erros analíticos, possibilitando ao laboratório a implantação de ações corretivas para eliminar as causas dos mesmos.

O controle externo, ou ensaio de proficiência, como também é conhecido, realiza um acompanhamento das tendências dos processos (inexatidão) relacionadas a características de linearidade, especificidade, sensibilidade, interferentes e calibração. No Brasil, o ensaio de proficiência vem sendo utilizado há mais de 30 anos como ferramenta de controle em laboratórios clínicos. Atualmente, os principais provedores são a Controllab, que tem parceria com a SBPC/ML, e o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), o qual possui vínculo com a SBAC.

O ensaio de proficiência tem o propósito de avaliar o desempenho do laboratório por meio de comparações interlaboratoriais. É uma ferramenta de controle de qualidade com base na avaliação de ensaios realizados por diferentes laboratórios em materiais idênticos ou similares.

Enquanto o controle interno é gerido pelo próprio laboratório, valorado internamente, em vários níveis e de uso frequente, o ensaio de proficiência é conduzido por uma terceira parte (o provedor). Além disso, possibilita uma comparação com o mercado ao ser valorado por vários laboratórios, mas com menor frequência e preferencialmente via painéis múltiplos. Essas características conferem maior capacidade de monitoração do erro aleatório ao controle interno e do erro sistemático ao ensaio de proficiência.

Segundo a RDC nº 302/2005 da Anvisa, o laboratório deve ter o ensaio de proficiência implantado para todos os ensaios da sua rotina para os quais existirem ferramenta disponível, com o propósito de determinar seu desempenho analítico. Para o laboratório participar ativamente e obter o resultado pretendido com o ensaio de proficiência, convém definir um responsável pelo programa, o qual deve conduzir toda a equipe na rotina relacionada com o programa, além de identificar e treinar a equipe envolvida no processo, determinando os responsáveis pelo recebimento, pela inspeção, distribuição, pelo armazenamento e pelo relato dos resultados obtidos.

Independentemente do tipo de programa, há um ciclo que se inicia com o recebimento do material (verificar temperatura, estado do material), o manuseio e o armazenamento do material (verificar a bula), a preparação do material, a análise do material (deve ser tratado de maneira idêntica ao paciente na rotina do laboratório), o relato de dados e resultados e, finalmente, a análise do resultado. Esta última etapa é fundamental para a eficiência da participação. O laboratório deve analisar criticamente os dados e definir ações corretivas, quando necessárias.

FASE PÓS-ANALÍTICA

Segundo a RDC nº 302/2005 da Anvisa, a fase pós-analítica é aquela que se inicia após a obtenção de resultados válidos das análises e termina com a emissão do laudo, para interpretação pelo solicitante. Na fase pós-analítica, a entrega do laudo deve ser eficiente, evitando trocas, extravios e dentro do *turnaround*, ou tempo de resposta (TAT). Os valores críticos devem ser avisados imediatamente.

Recomenda-se que a liberação dos exames seja realizada por interfaceamento para evitar erros de digitação. Além disso, sugere-se a conferência e a liberação final do exame serem realizadas por profissional de nível superior. O laudo do exame precisa ser arquivado por 5 anos. Atualmente, o resultado do exame pode ser arquivado eletronicamente e não há a necessidade de guardar o laudo impresso.

Os erros potenciais da fase pós-analítica são:

- Identificação incorreta do paciente.
- Transcrição de dados incorretos.
- Resultado ilegível.
- Unidades erradas.
- Não identificação de substâncias interferentes (hemólise, lipemia, ictérico).
- Especificidade, sensibilidade e precisão dos testes inadequados.
- Erros na interpretação dos resultados.
- Atraso na entrega dos exames.
- Não comunicação dos resultados críticos e erro na digitação.

O armazenamento de amostras da hematologia não pode ser longo, pois, por se tratar de sangue total, apresenta uma baixa estabilidade. O hemograma deve ser armazenado sob refrigeração (2°C a 8°C) por 24h, já o esfregaço sanguíneo na laminoteca à temperatura ambiente durante 30 dias.

RESULTADO CRÍTICO

O resultado crítico trata-se de um resultado que representa uma variação do estado fisiopatológico normal. Ele pode levar a risco de morte, a menos que alguma ação seja feita rapidamente. Médicos e/ou pacientes devem receber a comunicação

de resultados laboratoriais que exigem decisão rápida, além de ser uma exigência da Anvisa desde 2005.

Quando há resultados críticos, o analista precisa comunicar ao médico solicitante ou caso não se consiga falar com ele, convém informar o paciente ou o responsável. No hemograma, os principais valores críticos são (Tabela 2.1):

Tabela 2.1 Valores críticos para o hemograma

Parâmetros	Mínimo	Máximo
Hematócrito	18%	60%
Hemoglobina	6,0g/dL	20,0g/dL
Plaquetas	30.000 células/mm^3	900.000 células/mm^3
Leucócitos	1.000 células/mm^3	35.000 células/mm^3

3

Hemácias

HEMÁCIAS

As hemácias normais (Figura 3.1) apresentam-se em forma de discos bicôncavos, com 7 a 8μ de diâmetro. Além disso, sua biconcavidade aumenta a superfície de contato da célula, facilitando a troca de gases. São as células mais abundantes do sangue periférico, contendo cerca de 4,5 a 6,0 milhões/mm^3 nos homens e cerca de 4,1 a 5,5 milhões/mm^3 nas mulheres – compõem-se de 95% de hemoglobina e apenas 5% de enzimas e glicose. Por meio da degradação da glicose pela via glicolítica de Embden-Meyerhof, utilizada pela hemácia, obtém-se energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), do lactato e do potencial redutor NAD (nicotidamida adenina dinucleotídeo).

Sua principal função é o transporte de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), e a troca dos gases é feita pela diferença entre o pH do meio e a hemácia (efeito Bohn). Essas células circulam durante o período de, aproximadamente, 120 dias antes que sejam destruídas pelos macrófagos no sistema retículo endotelial do baço e grande parte de seus componentes absorvidos. A grande flexibilidade da hemácia ocorre em razão de seu citoesqueleto. Neste, a membrana composta por uma dupla camada lipídica está ligada por proteínas transmembranares, como a proteína 3 e as glicoforinas. Entretanto, a proteína mais importante do citoesqueleto é a espectrina.

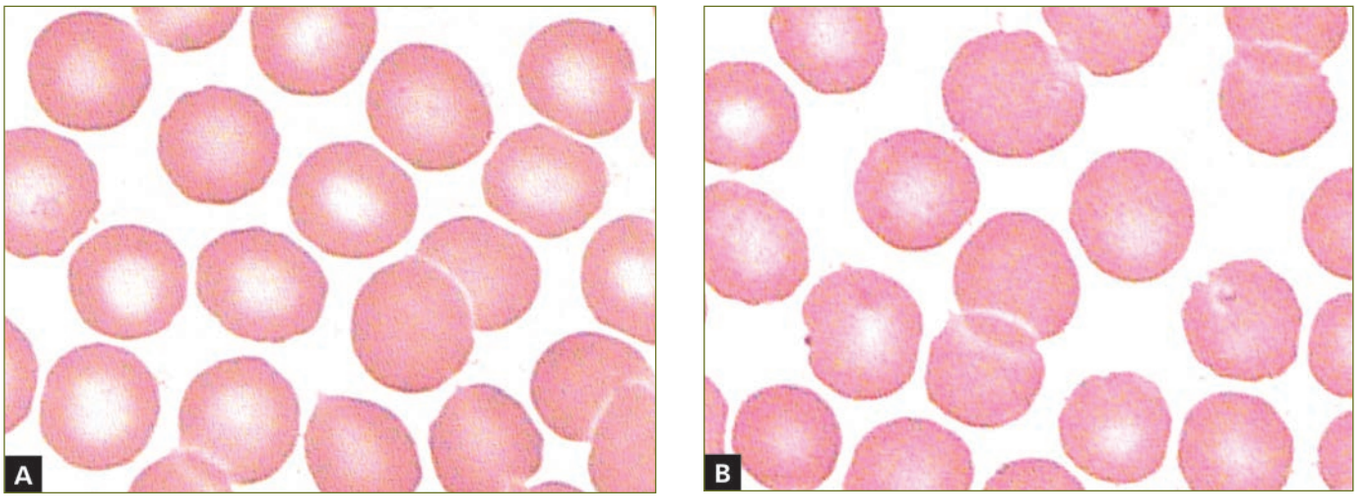


Figura 3.1 (**A** e **B**) Hemácias normocrômicas e normocíticas: concentrações de hemoglobinas normais; tamanho e morfologia sem alterações (2.000×)

ERITROPOESE

É o processo de produção de hemácias que ocorre na medula óssea em pacientes adultos normais, já que a eritropoese em fetos e pacientes com determinadas anemias graves pode ocorrer no baço ou no fígado. As hemácias são produzidas na primeira semana de vida no saco vitelino. No primeiro trimestre de gestação, ocorre no fígado e, no fim da gestação e pós-natal, na medula óssea e ossos longos. Até os 4 anos de vida, quase todos os ossos têm tecido hematopoético. Entretanto, serão substituídos gradativamente por gordura com o passar dos anos. Em torno dos 25 anos de idade, a produção de hemácias e demais células sanguíneas restringe-se aos ossos: crânio, vértebras, esterno, úmero, pelve, costelas e cabeça do fêmur.

A eritropoetina é uma glicoproteína que estimula os progenitores eritroides a formar mais eritroblastos. Esta glicoproteína é liberada pelas células adjacentes aos túbulos proximais renais quando ocorre hipoxia renal.

Na eritropoese, que envolve os processos de mitose, a produção de hemácias dura cerca de 7 a 8 dias com produção final de 16 hemácias. A vitamina B_{12} e o ácido fólico são importantes na proliferação celular (síntese de DNA); e o ferro e a vitamina B_6, na maturação (síntese de hemoglobina). Quando ocorrem deficiências desses nutrientes, pode haver alteração no tamanho (anisocitose) e na forma (pecilocitose) das hemácias. Na maturação megaloblástica, são observados eritroblastos anômalos em várias etapas de maturação, na medula óssea e no sangue periférico.

As células que fazem parte da eritropoese normal são:

- Proeritroblasto (Figura 3.2).
- Eritroblasto basófilo (Figura 3.3).
- Eritroblasto policromático (Figura 3.4)
- Eritroblasto ortocromático (Figura 3.5).
- Reticulócito (Figura 3.6).

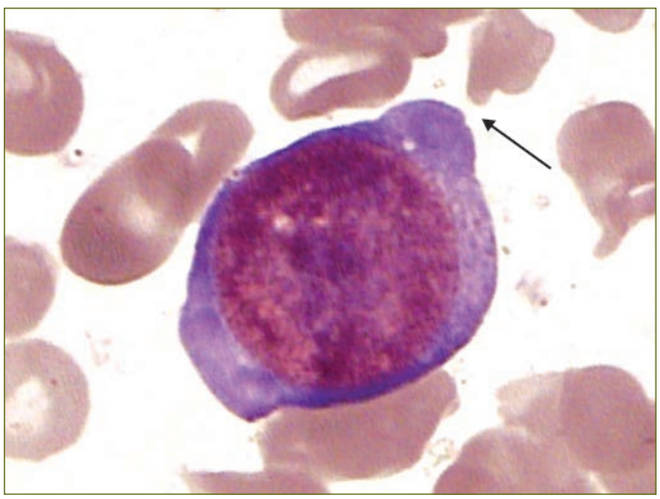


Figura 3.2 Proeritroblasto. É a primeira célula da série vermelha morfologicamente diferenciada e apresenta citoplasma intensamente basófilo com halo claro ao redor do núcleo. Em geral, pode exibir extrusões citoplasmáticas (*seta*). O tamanho costuma ser de 18 e 25µm de diâmetro. O núcleo é grande e arredondado com cromatina frouxa e nucléolos. Normalmente, constitui 1% da medula óssea

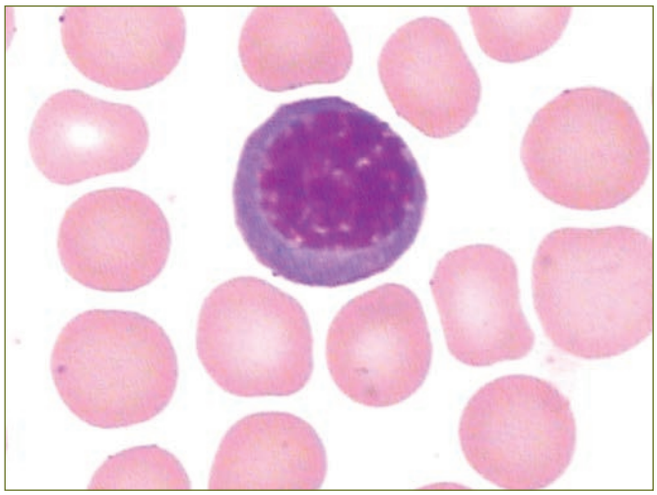


Figura 3.3 Eritroblasto basófilo: é a célula do segundo dia da eritropoese. O núcleo apresenta condensação de cromatina, já sem nucléolos visíveis. O citoplasma é mais basofílico devido ao início da hemoglobinização. O tamanho médio é de 16µm e constitui, aproximadamente, e de 1% a 4% das células da medula óssea

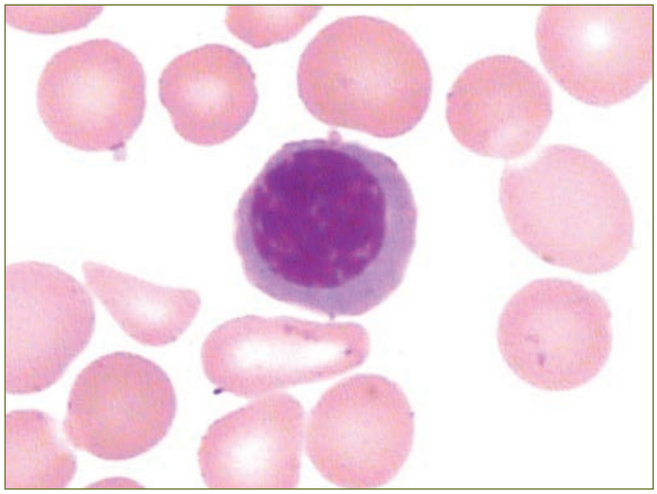


Figura 3.4 Eritroblasto policromático. Esta célula tem, em média, 13µm de diâmetro, com citoplasma de cor acinzentada, resultante da acidofilia da hemoglobina e da basofilia do RNA. O núcleo apresenta cromatina condensada. Os eritroblastos policromáticos constituem, em média, 2% a 5% das células da medula óssea

As Figuras 3.7 e 3.8 apresentam, respectivamente, a sequência da eritropoese e a maturação megaloblástica displásica.

HEMOGLOBINA

A molécula de hemoglobina (Hb) é um tetrâmero globular formado por duas cadeias alfa e duas beta (a_2 b_2). Cada cadeia é associada a um grupo heme, contendo um átomo de ferro. Este átomo tem a capacidade de se combinar reversivelmente com o O_2 molecular do CO_2, transportando-o (função principal da hemoglobina).

As duas globinas alfa e as duas beta (a_2 b_2) compõem a Hb A, que é a hemogloblina mais abundante no adulto (94% a 98%).

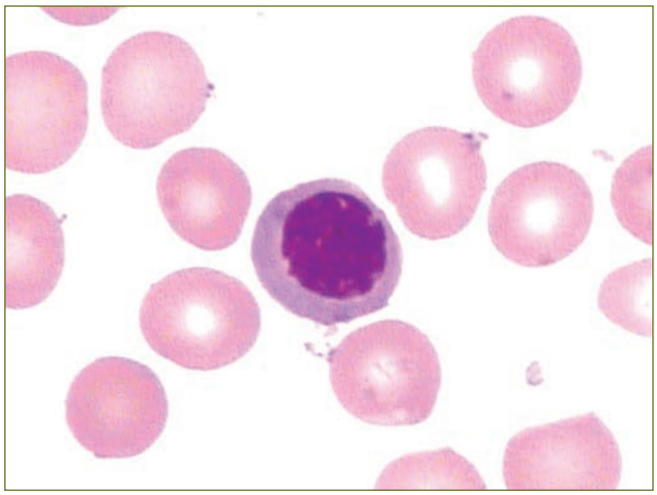


Figura 3.5 Eritroblasto ortocromático. Esta forma de maturação surge entre o 4º e o 5º dia do início da eritropoese, apresentando um núcleo picnótico e geralmente excêntrico. O citoplasma alaranjado indica a existência de acentuada síntese de hemoglobina. O tamanho é de 8 a 11µm. O eritroblasto ortocromático constitui, em média, de 5% a 10% das células da medula óssea

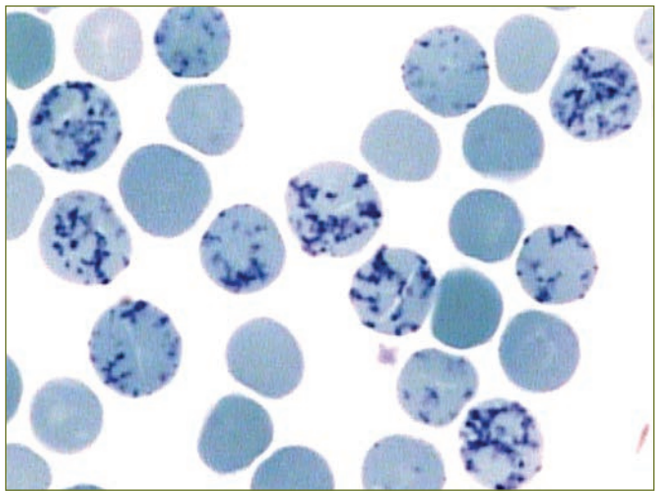


Figura 3.6 Reticulócito. Esta célula não apresenta núcleo e tem um tempo de maturação médio de 18h antes de se transformar em uma hemácia madura. Mantém uma capacidade residual de sintetizar proteínas e mitocôndrias. O reticulócito apresenta vestígios de RNA, responsável pela policromasia. Estas células surgem no 5º a 7º dia do início da eritropoese e são observadas apenas na coloração com o azul de cresil brilhante

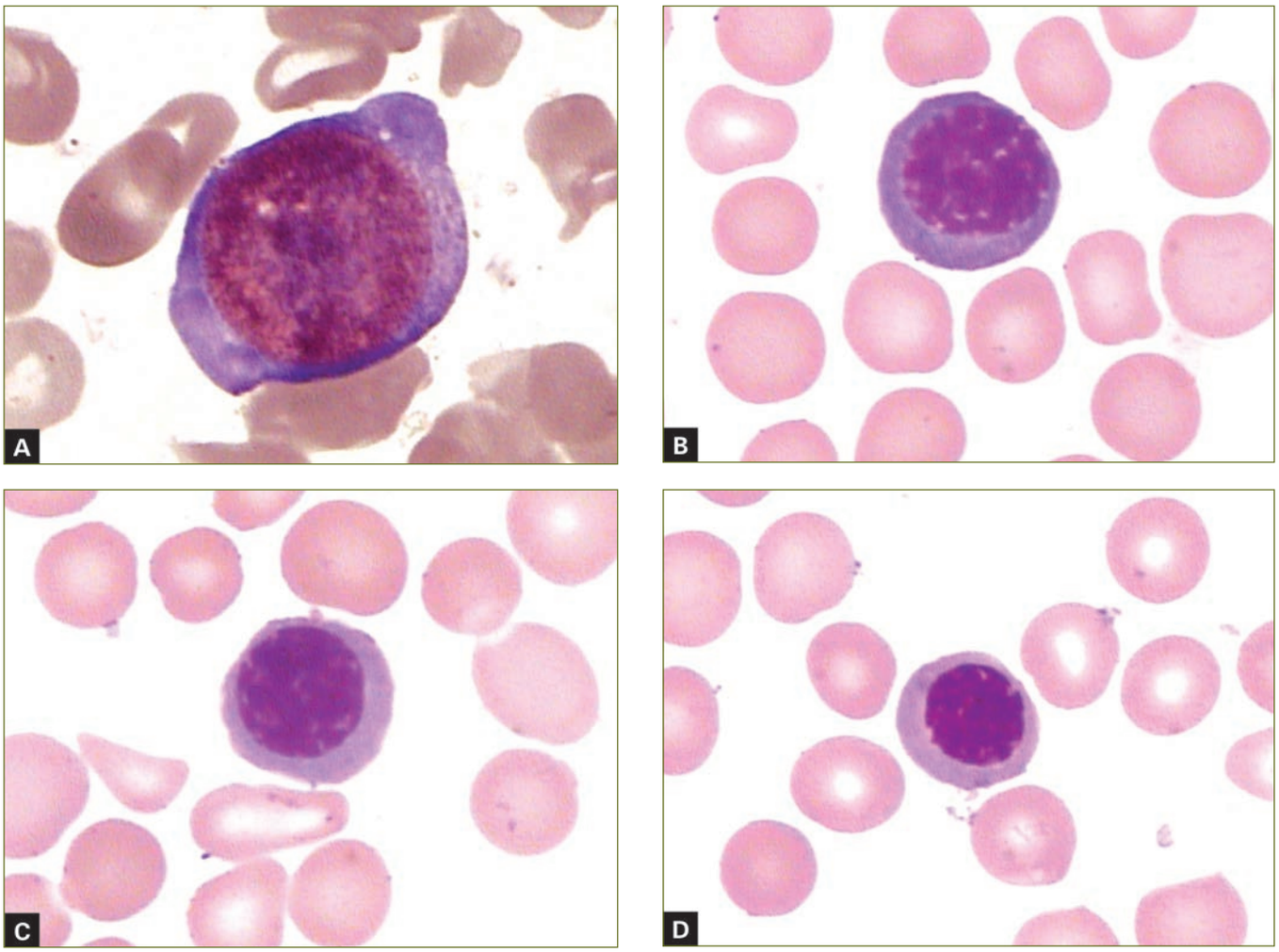
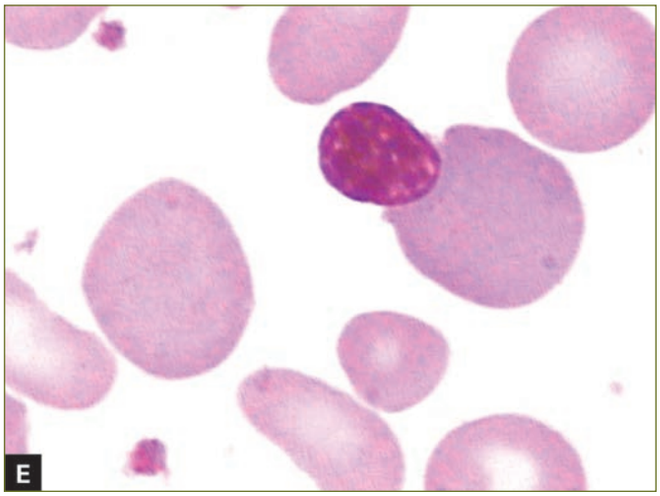


Figura 3.7 (**A** a **F**) Eritropoese: sequência de maturação eritroide. Proeritroblasto (**A**); eritroblasto basófilo (**B**); eritroblasto policromático (**C**); eritroblasto ortocromático (**D**) (2.000×) (*continua*)



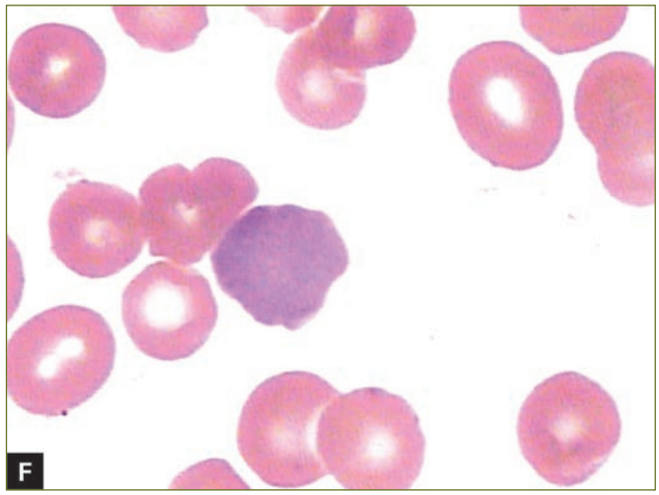
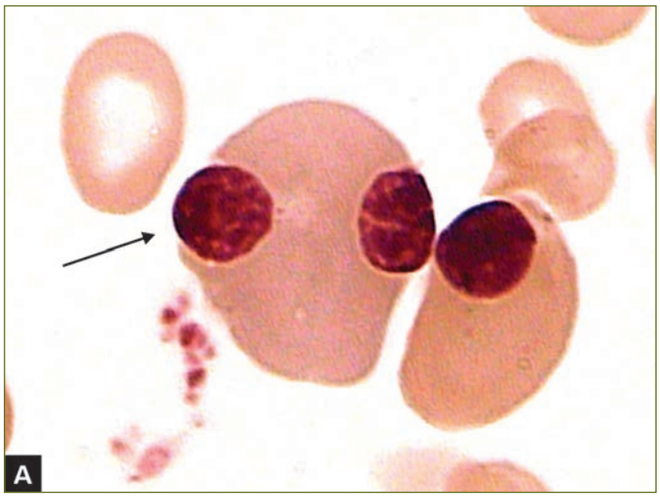
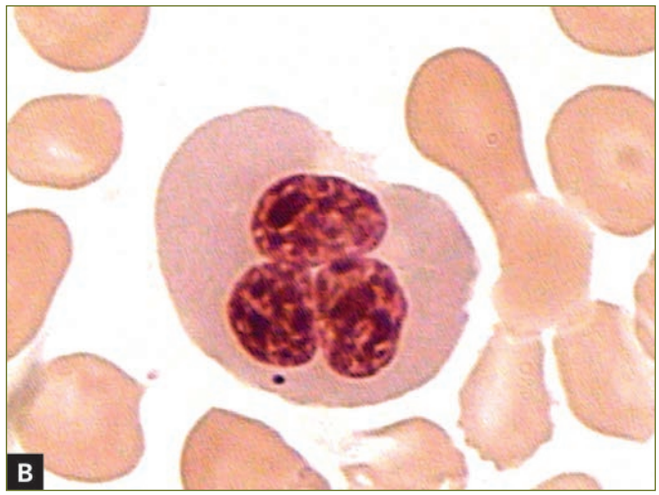


Figura 3.7 (**A** a **F**) (*continuação*) Eritropoese: sequência de maturação eritroide. Eritroblasto expulsando o núcleo (**E**); hemácia policromática (**F**) (2.000×)





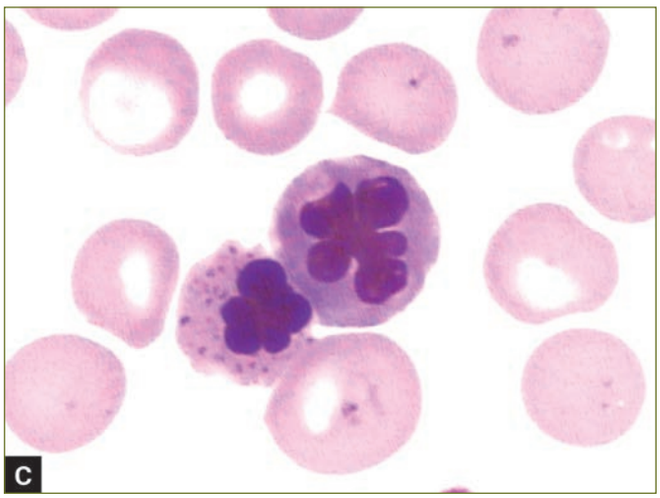


Figura 3.8 (**A** a **C**) Megaloblastos displásicos: eritroblasto megaloblasto (megalócito) binuclear (*seta*) (**A**); multinuclear (**B**); e eritroblasto com núcleo em formação em roseta (**C**) (2.000×)

Entretanto, a combinação dos diferentes tipos de globinas leva à formação dos seis tipos de hemoglobinas humanas normais (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Hemoglobinas humanas

Hb Gower – 1	Fase	Embrionária
Hb Portland	Fase	Embrionária
Hb Gower –2	Fase	Embrionária
Hb fetal	Fase	Fetal e pós-nascimento
Hb A	Fase	Pós-nascimento e adulta
Hb A_2	Fase	Pós-nascimento e adulta

Em média, o adulto normal apresenta 600g de Hb, que transporta 800mL de oxigênio. Aproximadamente 95% a 98% da hemoglobina está combinada ao oxigênio. Avalia-se a hemoglobina em g/dL no sangue, e este é o parâmetro utilizado para definir se há ou não um estado anêmico no paciente. Os índices hematimétricos hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) avaliam as concentrações de Hb intracelulares.

HEMATÓCRITO

O hematócrito é a razão entre o volume total de hemácias em relação ao volume total da amostra de sangue. Os resultados dos hematócritos são expressos em porcentagem (%), a qual representa a proporção de hemácias em cada 100mL de sangue. O hematócrito pode ser determinado indiretamente pelo método automatizado calculado pela multiplicação do volume corpuscular médio (VCM) pela contagem de hemácias ou pelo método direto, utilizando a centrifugação pelos micrométodos e macrométodos. O hematócrito consiste em um dos exames mais importantes na avaliação da série vermelha, devido à boa reprodutibilidade e à precisão.

ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM foram incluídos no hemograma por Wintrobe nos anos 1940, mas ainda são bastante utilizados na classificação de anemias. Esses três índices são calculados a partir da contagem de hemácias, do hematócrito e da dosagem de hemoglobina. O RDW (distribuição do tamanho das hemácias – *red cell distribution width*) é o outro índice hematimétrico que compõe o eritrograma, apenas fornecido pelos contadores hematológicos automatizados. É muito importante observar a relação de coerência entre os níveis hematimétricos e os índices eritrocitários e correlacionar com o estudo do esfregaço em caso de alterações.

O VCM analisa a média do tamanho das hemácias (volume). O resultado é expresso em femtolitros (fL), e os valores normais são de 80 a 98fL. Assim, as hemácias com tamanho abaixo de 80fL são microcíticas e aquelas com tamanho acima de 98fL, macrocíticas. Para calcular o VCM, utiliza-se a fórmula:

$$VCM = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Contagem de hemácias} \times 10^6}$$

A HCM avalia o conteúdo médio de hemoglobina por hemácia (hipocrômia). O resultado é expresso em picogramas (pg) e os valores normais são de 28 a 33pg. Assim, as hemácias com HCM abaixo de 28pg são hipocrômicas e aquelas com HCM superior a 33, hipercrômicas. As hemácias com HCM dentro da normalidade são normocrômicas. Para calcular o HCM, utiliza-se a fórmula:

$$HCM = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Contagem de hemácias} \times 10^6}$$

A CHCM mede a hemoglobina encontrada em 100mL de hemácias. Ela possibilita a avaliação do grau de saturação de hemoglobina na hemácia (hipocrômia). A CHCM associada a HCM classifica as hemácias em normocrômicas, hipocrômicas ou hipercrômicas. O resultado é expresso em decilitros (g/dL) e os valores normais são de 32 a 35g/dL. Para calcular a HCM, utiliza-se a fórmula:

$$CHCM = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Hematócrito}}$$

O RDW é a amplitude de distribuição das células vermelhas (hemácias), índice possível apenas por meio de contadores hematológicos automatizados. Ele analisa o grau de variação no tamanho das hemácias – trata-se de um índice de anisocitose. É útil para diferenciar algumas anemias, como a anemia ferropriva das talassemias. O resultado é expresso em porcentagem (%) e os valores normais são de 11% a 15%. Resultados superiores a 15% já demonstram um grau de anisocitose no esfregaço do sangue periférico.

ALTERAÇÕES NAS HEMÁCIAS

Anisocitose

Anisocitose é o termo usado para indicar alteração no tamanho da hemácia (do grego *aniso*, "diferente"). A anisocitose é vista praticamente em quase todas as anemias, sendo bastante inespecífica. Esta variação do tamanho da hemácia também pode ocorrer em pacientes com contagem de hemácia, dosagem de hemoglobina e hematócrito normais. O índice hematológico automatizado RDW é o contador numérico da anisocitose (Figura 3.9). A anisocitose pode ocorrer com média de hemácias de tamanho normal, com microcitose ou macrocitose:

- **Microcitose**: média de hemácias com diâmetros abaixo de 80fL, no adulto. Geralmente associada a deficiência de ferro, talassemias e anemias sideroblásticas.
- **Macrocitose**: média de hemácias com diâmetros acima de 98fL, no adulto. Geralmente associada a deficiência de vitamina B_{12}, doença hepática, quimioterapia e hipotireoidismo.

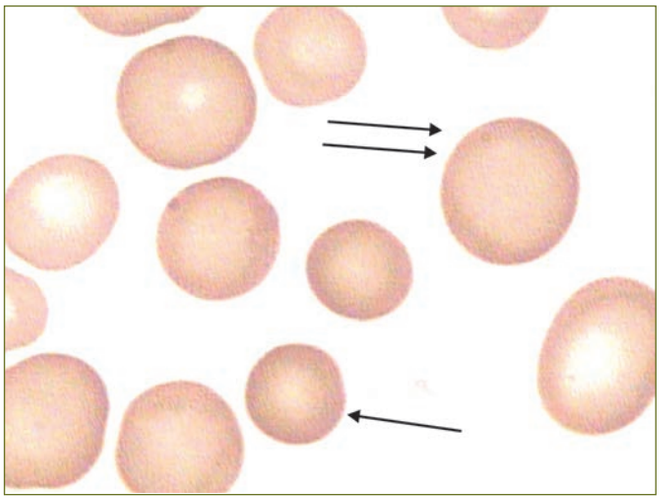


Figura 3.9 Anisocitose evidente: presença de micrócito (*uma seta*) e macrócito (*duas setas*) (2.000×)

Hipocromia

Na hipocromia, os índices hematimétricos HCM e CHCM estão baixos, confirmando a baixa concentração de hemoglobina na célula e produzindo hemácias menos coradas do que o normal. Na hematoscopia, observa-se um aumento do halo central da hemácia. Também conhecida como hemácia "fantasma" (Figura 3.10), a hipocrômica tem evidente palidez central e variação de tamanho (anisocitose, com predomínio de micrócitos). A hemácia hipocrômica é encontrada em algumas anemias, principalmente na anemia ferropriva na forma acentuada.

Hipercromia

O termo hipercromia é utilizado quando a hemácia cora mais intensamente que uma hemácia normal. Em geral, a CHCM está aumentada indicando maior concentração real de hemoglobina intracelular, e não uma alteração morfológica, a qual pode promover uma alteração na concentração de hemoglobina na hemácia. As hemácias irregularmente contraídas, os esferoacantócitos e os esferócitos são as células que apresentam hipercromia (Figura 3.11).

Anisocromia

A anisocromia é uma variação de coloração ou hemoglobinização entre as hemácias, com desigualdade na distribuição da hemoglobina entre as células. É vista no esfregaço do sangue periférico hemácias normocrômicas e hipocrômicas no mesmo campo (Figura 3.12).

Geralmente, em uma situação de mudança no sangue, pode ocorrer anisocromia. Após transfusão sanguínea e no desenvolvimento ou na regressão na anemia de doenças crônicas também.

Alguns aparelhos hematológicos mais modernos contêm um índice que avalia a anisocromia, que é a amplitude de distribuição da hemoglobina (HDW).

Policromasia

O termo é utilizado para descrever hemácias que apresentam variação de cor, mas geralmente exibem coloração róseo-azulada (Figura 3.13). Isso ocorre por causa da captação simultânea de corantes básicos pelo RNA ribossômico e à captação da eosina pela hemoglobina. Existe uma grande associação entre a hemácia policromática e o reticulócito (ambos são hemácias imaturas), mas o número de hemácias policromáticas no sangue periférico é menor que a contagem de reticulócitos. Isso demonstra que a policromasia ocorre apenas em reticulócitos mais imaturos. A hemácia policromática também pode ser diferenciada das hemácias normais no esfregaço do sangue periférico, pelo diâmetro aumentado, pela ausência da palidez central e pelo contorno celular irregular, além do aspecto policromático.

Nas anemias hemolíticas, na mielofibrose e nos carcinomas metastáticos ocorre evidente policromasia.

Pecilocitose

Hemácia em lágrima

A hemácia em lágrima também é conhecida como dacriócito, hemácia em gota, hemácia em raquete ou hemácia em pera (Figura 3.14). É observada com maior frequência na mielofibrose, na talassemia beta maior e na anemia megaloblástica,

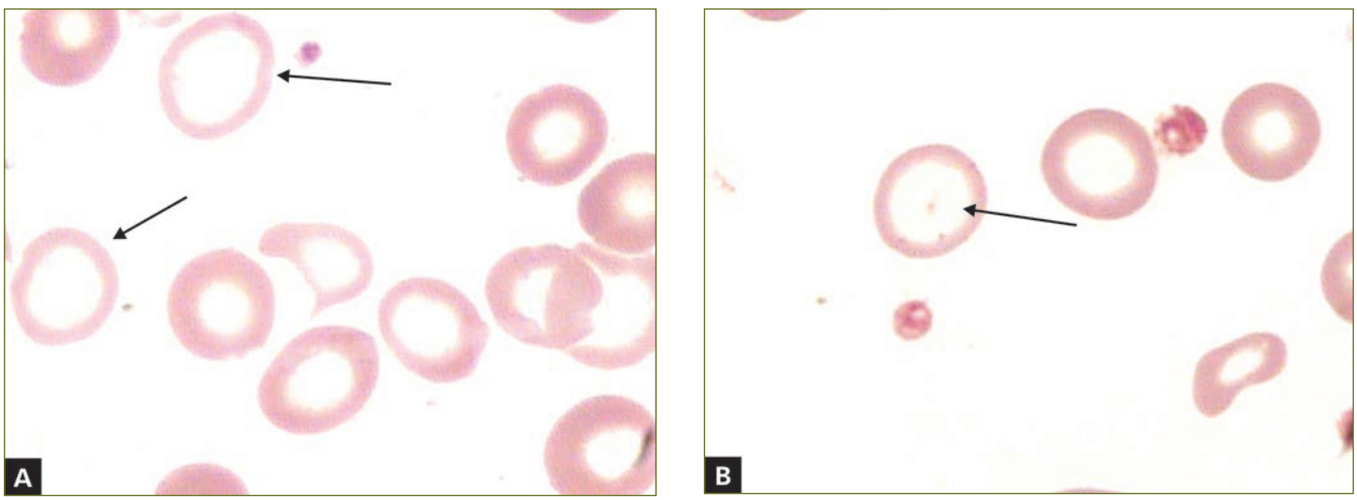


Figura 3.10 (**A** e **B**) Hipocromia: hemácias fantasmas (*setas*)

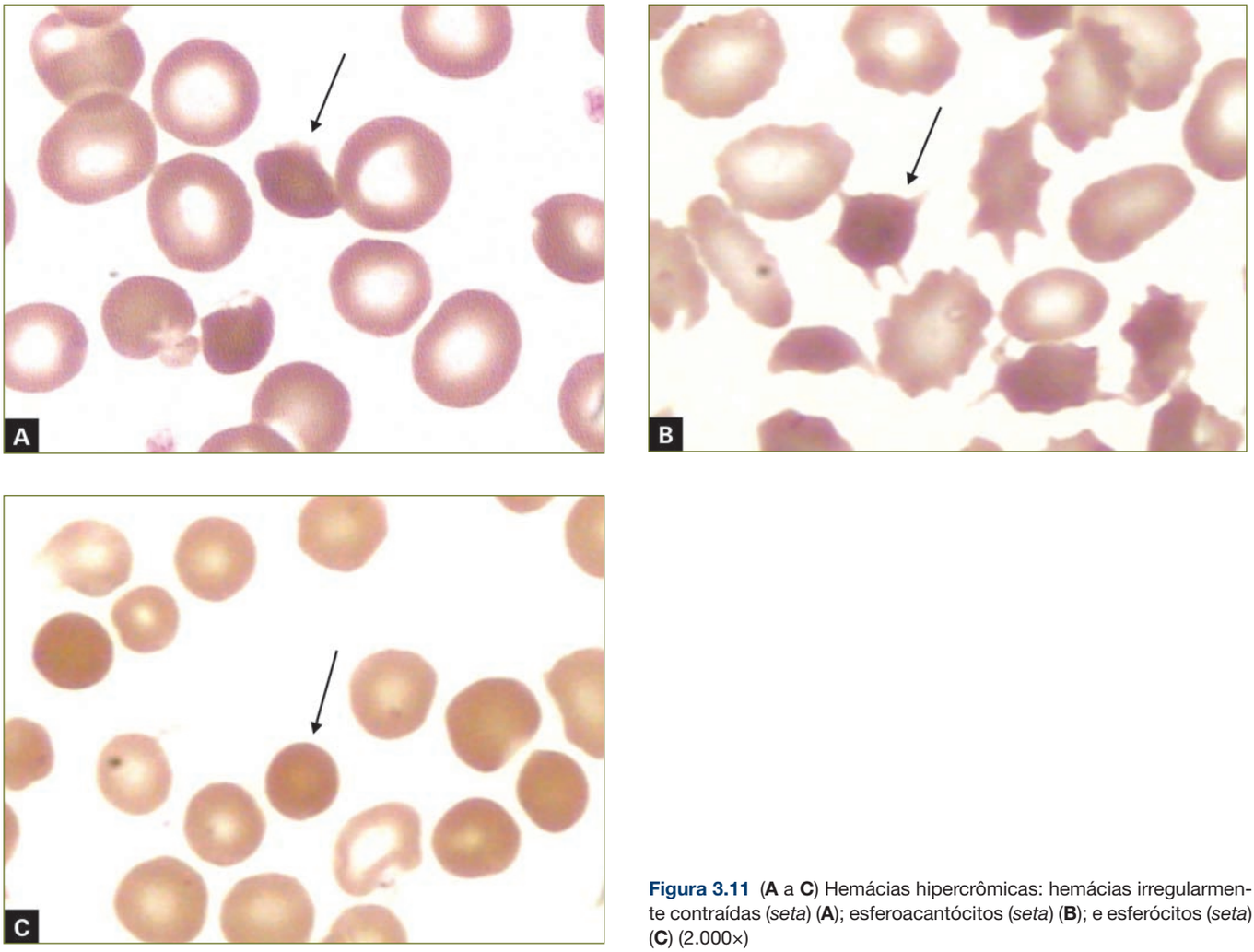


Figura 3.11 (**A** a **C**) Hemácias hipercrômicas: hemácias irregularmente contraídas (*seta*) (**A**); esferoacantócitos (*seta*) (**B**); e esferócitos (*seta*) (**C**) (2.000×)

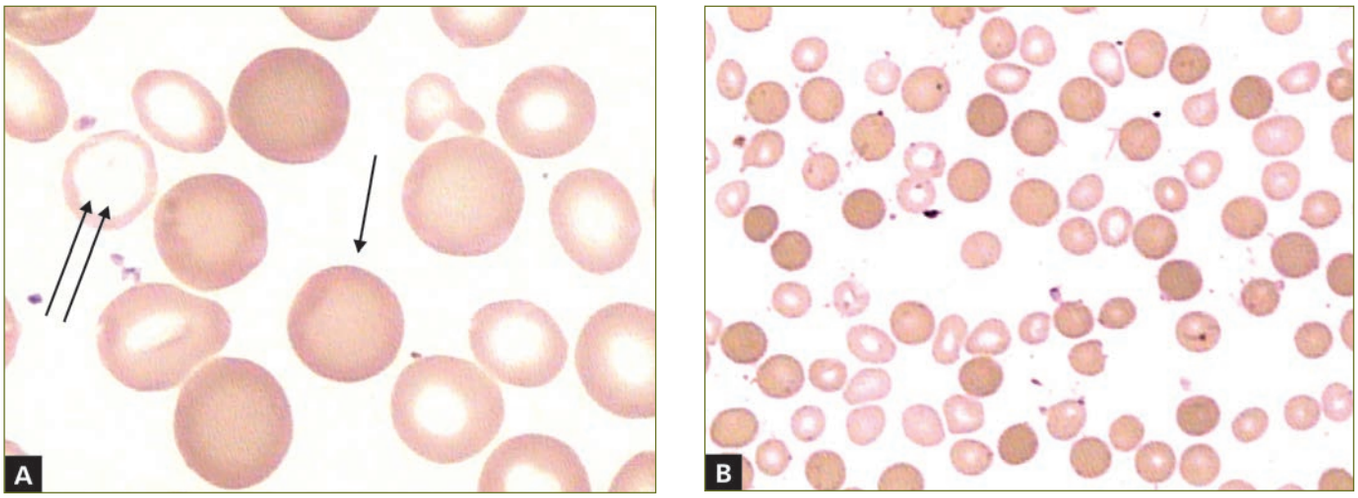


Figura 3.12 (**A** e **B**) Anisocromia. Hemácia normocrômica (*uma seta*) e hipocrômica (*duas setas*) (2.000×)

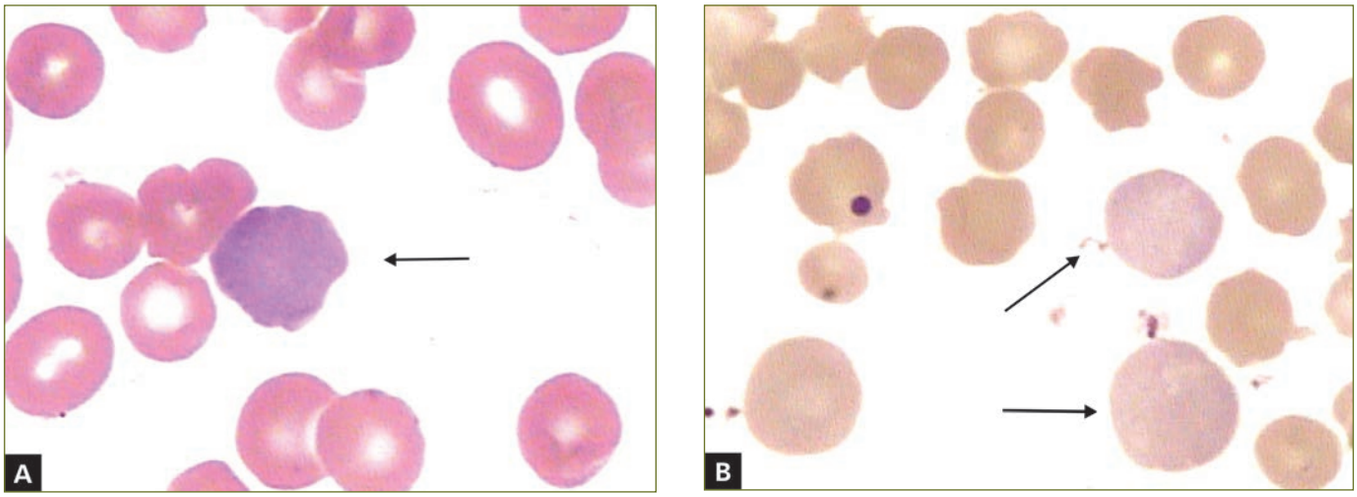


Figura 3.13 (**A** e **B**) Policromasia: hemácias de coloração róseo-azulada (*setas*) (2.000×)

sendo raramente encontradas nas anemias hemolíticas, na deseritropoese e na síndrome mielodisplásica.

Nas anemias com oxidação da hemoglobina e formação de corpos de Heinz, também é possível observar hemácias em lágrima. Após esplenectomia, as hemácias em lágrima diminuem em muito em pacientes com mielofibrose e talassemia maior. Isso pode indicar a existência de hematopoese extramedular ou danos causados pela atividade fagocitária aumentada dos macrófagos do baço. Estas teorias explicam a formação dessa forma de hemácia.

Eliptócito

A morfologia característica do eliptócito deve-se a um defeito na proteína de membrana espectrina. A hemácia com esse defeito perde a elasticidade normal e, quando passa em um vaso sanguíneo de pequeno calibre, deforma-se e não volta mais ao formato normal, tornando-se um eliptócito (Figura 3.15). A existência de um grande número de eliptócitos no sangue periférico sugere anormalidade genética, como a "eliptocitose hereditária" – que varia de 25% a 90% o número de eliptócitos. Os eliptócitos em número igual ou menor que 10% são vistos em algumas talassemias, anemias megaloblásticas e anormalidades enzimáticas herdadas, além de acometer pacientes portadores de hepatite C e com deficiência em ferro.

É importante diferenciar o eliptócito do ovalócito com a ideia de que, para ser um eliptócito, a célula necessita ter o eixo longo maior que o dobro do eixo curto e, para ser um ovalócito, a célula tem que ter o eixo longo menor que o dobro do eixo curto.

Ovalócito/macro-ovalócito

É uma alteração de membrana celular que pode ser genética ou não. No caso da ovalocitose hereditária, é uma anemia hemolítica de defeito de membrana e mais comum no sudoeste

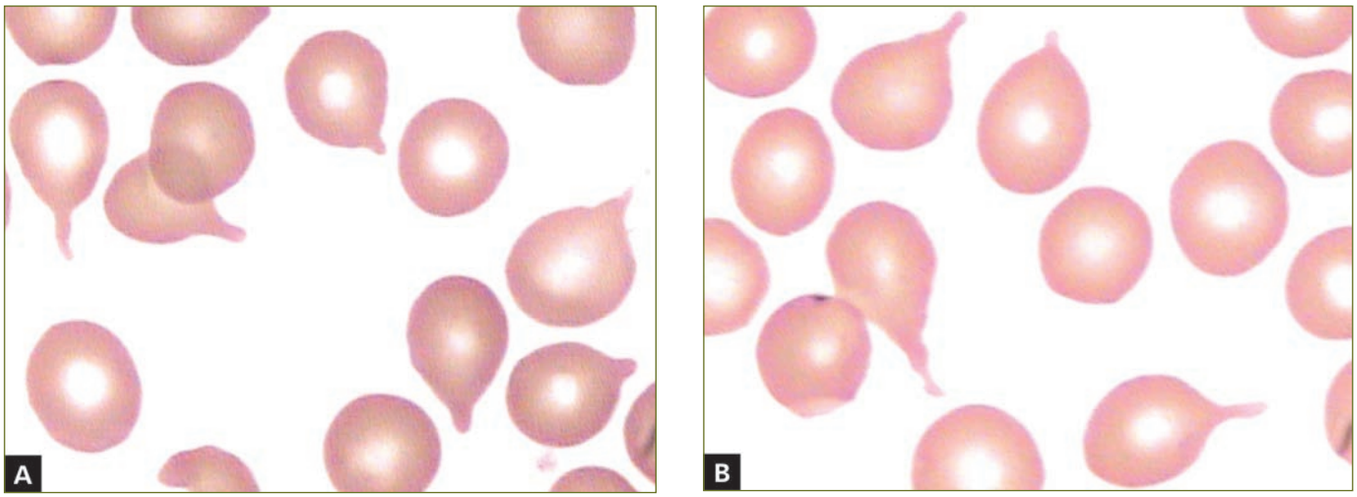


Figura 3.14 (**A** e **B**) Hemácias em lágrima (2.000×)

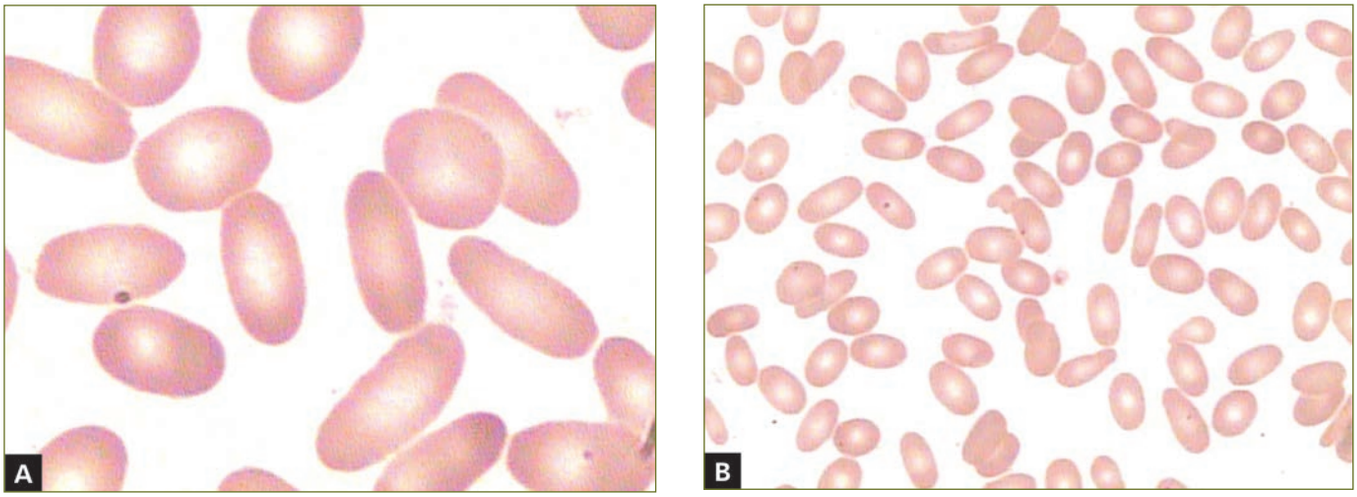


Figura 3.15 (**A** e **B**) Eliptócitos (2.000×)

da Ásia, conhecida como "ovalocitose do sudoeste da Ásia". Conforme já descrevemos, existe uma regra para diferenciar o eliptócito do ovalócito: para ser um ovalócito, a célula necessita o eixo longo menor que o dobro do eixo curto (Figura 3.16A). O ovalócito é observado também em pequena quantidade ou raramente em algumas anemias.

O macro-ovalócito é uma forma de hemácia observada frequentemente no sangue periférico dos pacientes com anemia megaloblástica, ou seja, com deficiência de vitamina B_{12} e ácido fólico, mas pode ser observada raramente na mielofibrose ideopática. Em geral, o macro-ovalócito é uma hemácia policromática, apresentando-se em tom azul-acinzentado na coloração do esfregaço sanguíneo (Figura 3.16B). Como sua formação deve-se à deficiência da vitamina B_{12} e ácido fólico (nutrientes necessários para algumas etapas da eritropoese que, em condições normais, ocorre em 8 dias), o macro-ovalócito é formado em menos de 2 dias. Isso leva à formação de uma hemácia com citoesqueleto imaturo, de tamanho aumentado e policromática.

Macrócito policromático

O macrócito policromático é um reticulócito imaturo que surge no sangue periférico com uma etapa de maturação entre 30 e 70h (Figura 3.17). É uma célula de resposta da medula óssea a grandes perdas de sangue e hemorragias agudas, o que demonstra a necessidade urgente de reposição de hemácias pela medula óssea. O macrócito policromático também é conhecido com o nome *shift cell*, que em português significa mudança, troca ou substituição, e isso indica a verdadeira função desta célula: reposição e substituição imediata de hemácias.

Esquizócito

O esquizócito é uma hemácia com morfologia bastante variável, muito irregular e geralmente com a metade do tamanho de uma hemácia normal (Figura 3.18). Os defeitos na forma do esquizócito são chamados de "quebras ou mordidas" costumam ocorrer no baço, mais especificamente no sistema reticuloendotelial.

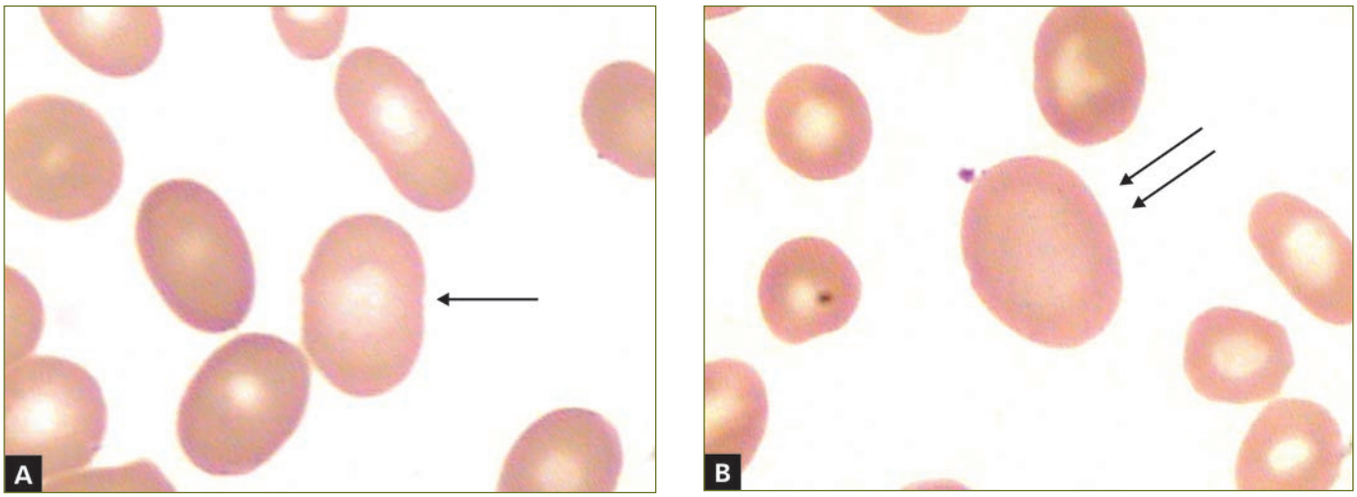


Figura 3.16 (**A** e **B**) Ovalócito (*uma seta*) e macro-ovalócito (*duas setas*) (2.000×)

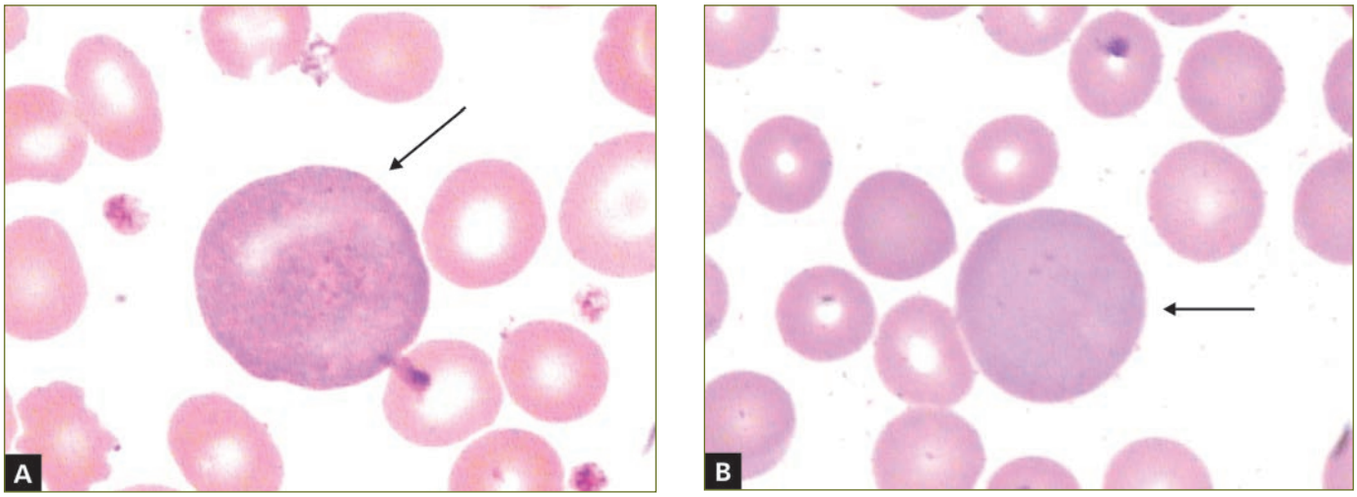


Figura 3.17 (**A** e **B**) Macrócitos policromáticos (*setas*) (2.000×)

O esquizócito é uma hemácia que forma muitos corpúsculos de Heinz (gerados a partir de hemoglobinas instáveis ou por oxidação da hemoglobina, precipitando-se e aderindo na membrana da hemácia). Já os macrófagos são as células que fagocitam os corpúsculos de Heinz. A fim de evitar a lise da hemácia, os macrófagos vão retirando por fagocitose os corpúsculos de Heinz, deixando o esquizócito com a morfologia de uma célula com várias "mordidas". São comuns a alguns ou raros esquizócitos em diversos tipos de anemias, porém se observa o aumento do número de esquizócitos nas anemias hemolíticas por queimaduras e implantes de próteses, em que se formam por ação mecânica.

Esquizócito em capacete

É uma hemácia também conhecida como "hemácia em elmo" ou *helmet cell* na literatura médica inglesa (Figura 3.19). É um tipo de esquizócito que tem sua formação a partir de traumatismo mecânico (fragmentação física) com coágulos de fibrina intravascular.

O esquizócito em capacete é característico na púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), junto com os fragmentos de hemácias e a contagem de plaquetas baixas, formando o quadro citomorfológico da doença no sangue periférico. O esquizócito em capacete é uma célula típica e diferencia-se dos demais esquizócitos por manter mesma forma.

Fragmentos de hemácias

Os fragmentos de hemácias surgem da ação mecânica direta sobre sua estrutura. Isso acontece quando a hemácia passa por um capilar sanguíneo com fibrina aderida no endotélio, ou mediante o contato com uma superfície anormal, como uma válvula cardíaca (Figura 3.20). Na PTT, a hemácia ainda íntegra passa pelo capilar sanguíneo e adere às fibrinas. Desse modo, apenas alguns fragmentos se soltam, dando origem aos

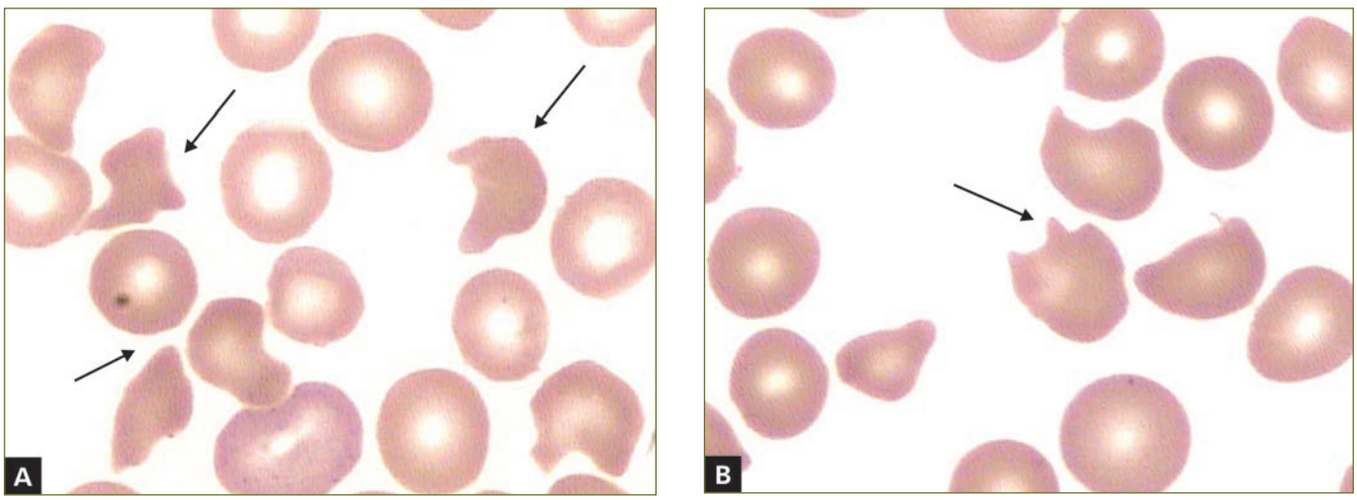


Figura 3.18 (**A** e **B**) Esquizócitos: várias formas (*setas*) (2.000×)

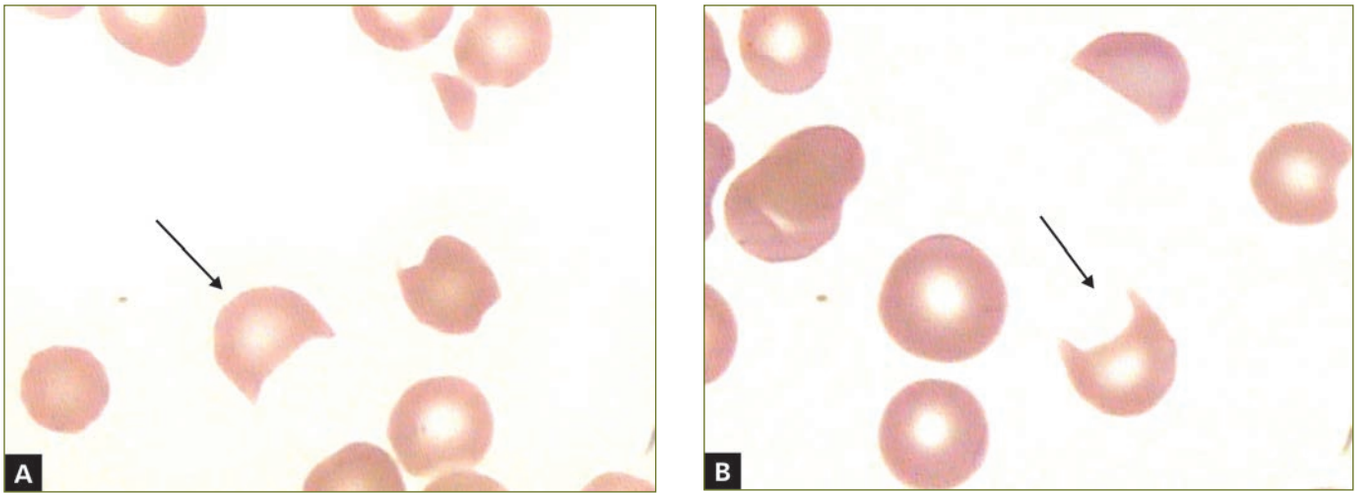


Figura 3.19 (**A** e **B**) Esquizócitos em "capacete" (*setas*) (2.000×)

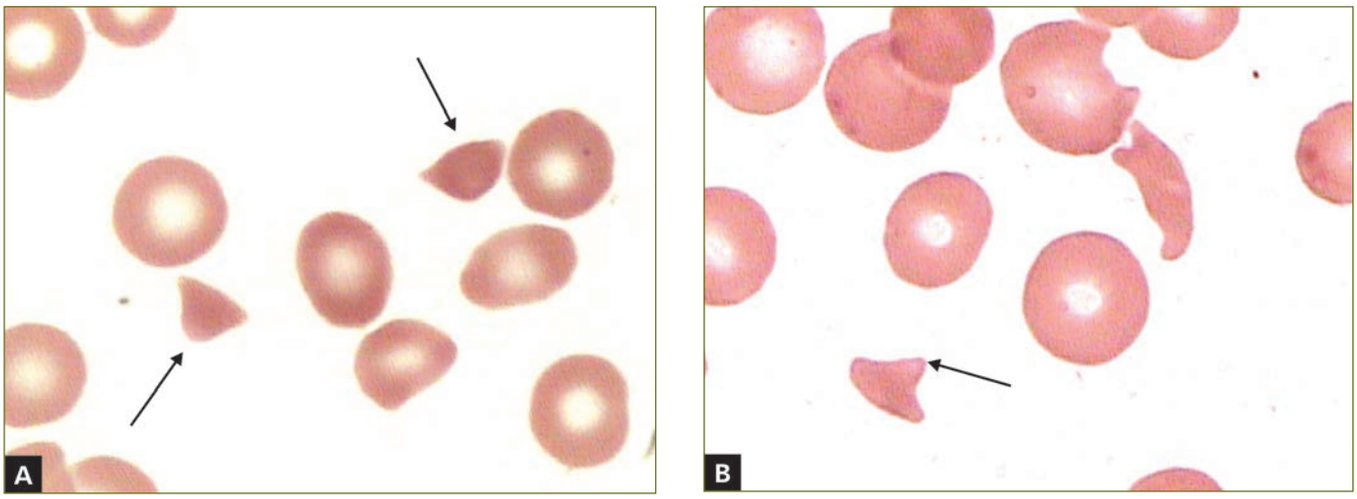


Figura 3.20 (**A** e **B**) Fragmentos de hemácias (*setas*) (2.000×)

fragmentos de hemácias que, junto dos esquizócitos em "capacete", compõem o diagnóstico da PTT. Essas células são encontradas na síndrome hemolítica urêmica, nas anemias microangiopática, na sepse por bactérias Gram-negativas e também na hipertensão maligna. A síndrome da fragmentação das hemácias ocorre após algumas dessas alterações.

Acantócito

É uma hemácia que apresenta projeções citoplasmáticas denominadas espículos, distribuídas irregularmente ao redor da célula (Figura 3.21). O acantócito tem espículos de tamanho variável e em menor quantidade que a hemácia crenada. No distúrbio hereditário denominado abetalipoproteinemia, o colesterol, entre outros lipídios, são mal absorvidos, promovendo a formação de acantócitos, já que a composição da membrana da hemácia é lipoproteica.

Os acantócitos são encontrados também nas cirroses, nas anemias hemolíticas associadas ao fígado, na administração de heparina, no hemagioma hepático, nas hepatites neonatal e na pós-esplenectomia. A baixa produção de plasma torna a membrana celular da hemácia mais propícia a defeitos. Isso é mais um dos motivos da formação desta alteração morfológica.

Esferoacantócito

A betaespectrina mutante está associada à formação de esferócitos e acantócitos, podendo ocasionar o surgimento de esferoacantócitos (Figura 3.22). No entanto, pacientes esplenectomizados anteriormente com esferócitos no esfregaço do sangue periférico podem apresentar estas células em grande número.

Na síndrome hemolítico-urêmica, é muito comum a existência de esferoacantócitos, entre outras formas de pecilócitos vistas nessa síndrome.

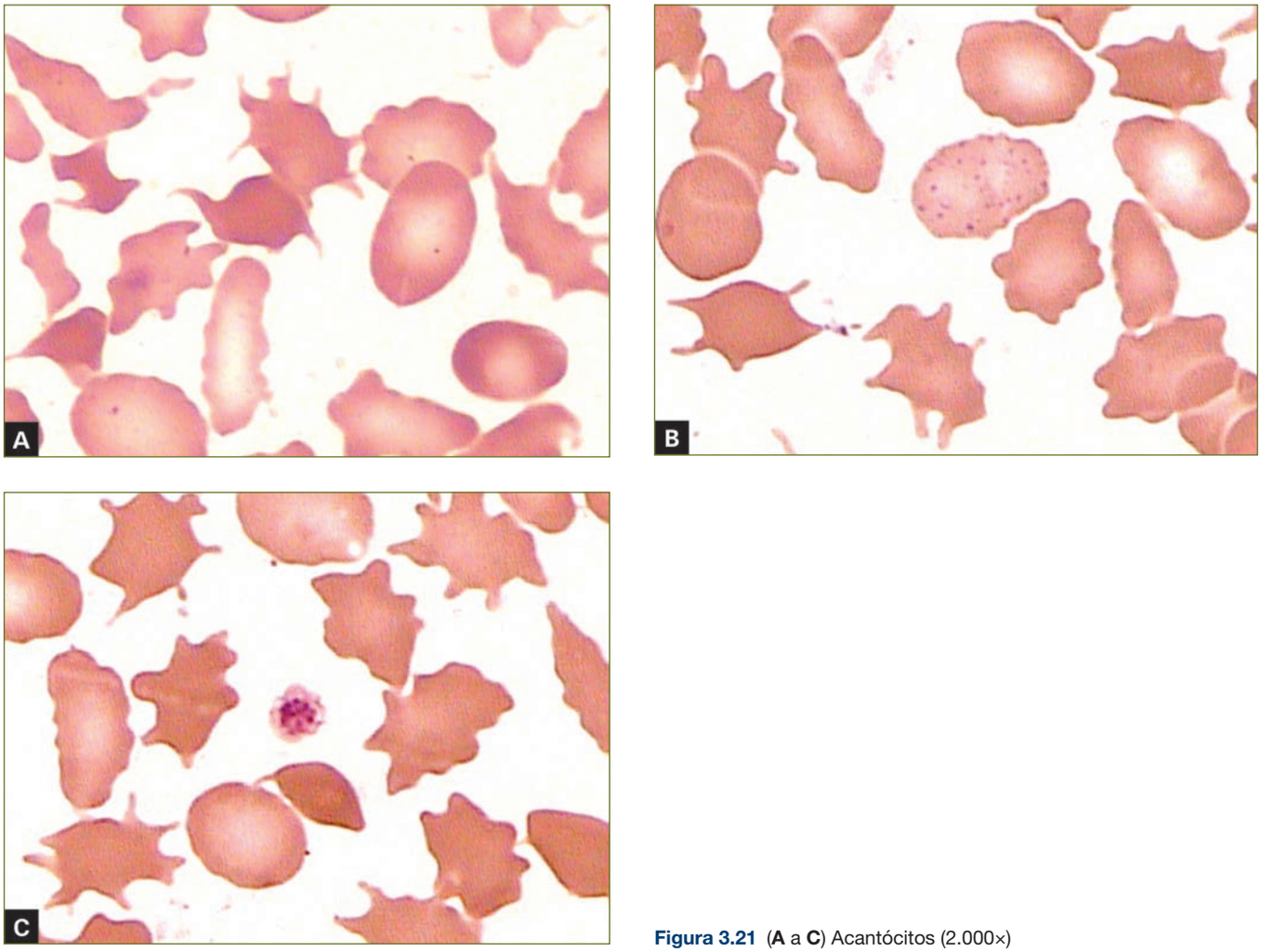


Figura 3.21 (**A** a **C**) Acantócitos (2.000×)

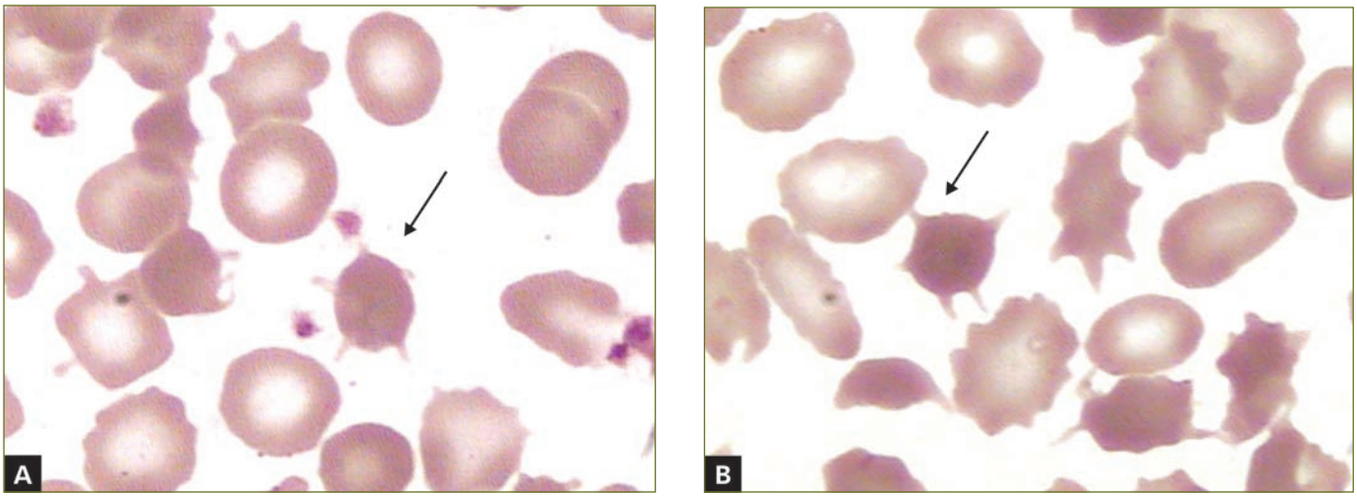


Figura 3.22 (**A** e **B**) Esferoacantócitos (*setas*) (2.000×)

Hemácia falciforme

A hemácia falciforme, também conhecida como drepanócito ou hemácia em "foice", pode se apresentar sob várias formas no sangue periférico. As mais comuns são as formas em "foice" (Figura 3.23). A hemoglobina S polimeriza-se e leva a hemácia ao processo de falcização. Esta condição depende da tensão de oxigênio, temperatura e concentração intracelular de Hb S.

Após a polimerização da Hb S com a falcização da hemácia, a bomba de sódio e potássio da célula sofrem alteração na sua função, diminuindo os níveis de potássio e de água intracelular e elevando a concentração de sódio, tornando a hemácia mais densa com menos capacidade de permeabilidade celular. Estas alterações morfológicas repetitivas provocam lesões crônicas na membrana da hemácia tornando-a irreversivelmente falcizada.

Os pacientes homozigotos (Hb SS) têm um percentual de hemácias irreversivelmente falcizadas entre 4% e 44% do total, geralmente em número constante na mesma pessoa e com pouca variação individual. Dessa maneira, as hemácias irreversivelmente falcizadas são formadas logo após sua saída da medula óssea nesses pacientes e retiradas brevemente por fagocitose e hemólise intravascular.

No esfregaço do sangue periférico, a hemácia falciforme cora mais intensamente que uma hemácia normal. Isso ocorre por causa da polimerização da Hb S.

Hemácia fusiforme

Alguns pacientes portadores do genótipo Hb AS apresentam no esfregaço de sangue periférico células com morfologia alongada e extremidades afiadas denominadas hemácias fusiformes (Figura 3.24). Esta forma da hemácia ocorre pelo rompimento no processo de falcização. Geralmente, a hemácia fusiforme forma-se na secagem da lâmina quando há falta de oxigênio. Como a falcização é incompleta, a célula fica com o formato fusiforme. Contudo, há casos em que a confecção da lâmina é defeituosa, o que facilita a formação de artefatos com distensão celular similar à hemácia fusiforme.

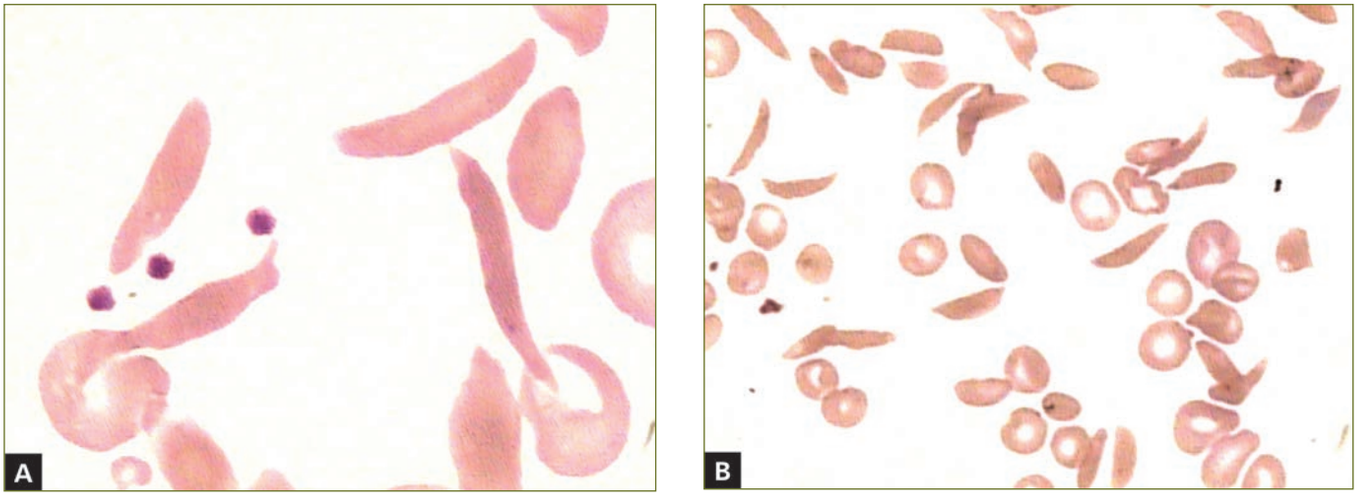


Figura 3.23 (**A e B**) Hemácias falciformes (2.000×)

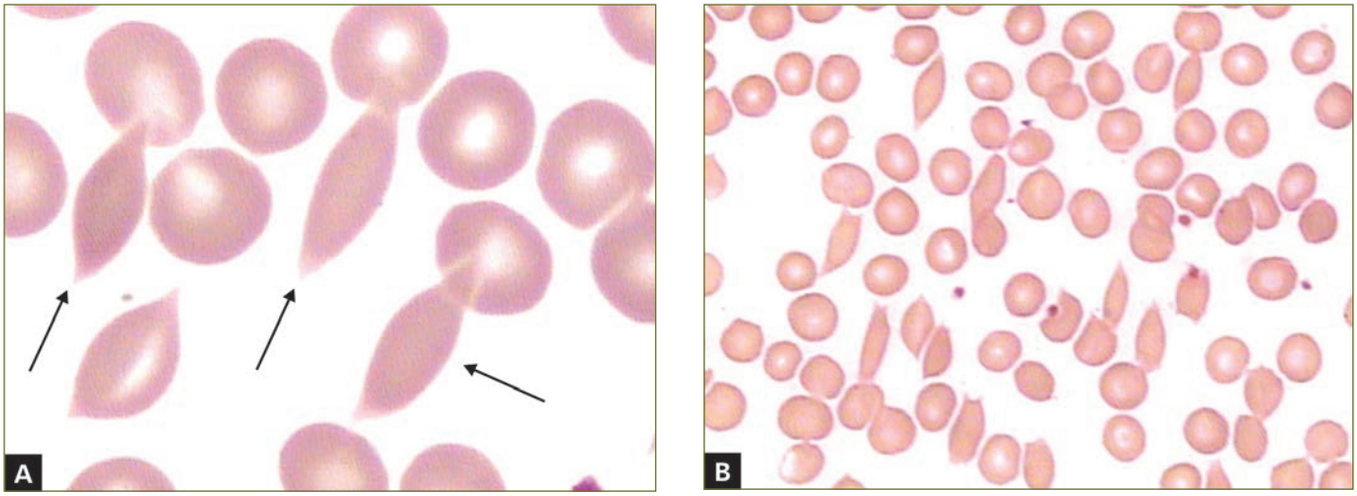


Figura 3.24 (**A** e **B**) Hemácias fusiformes (*setas*) (2.000×)

Hemácia em alvo

A hemácia em alvo, ou codócito, apresenta uma pequena área central redonda com coloração normal. Em volta, existe uma área branca sem coloração e depois um anel normocrômico periférico, formando uma biconcavidade (Figura 3.25). Esta forma deve-se à célula ter mais membrana celular com relação ao volume intraeritrocitário. Tal defeito celular está relacionado com a má distribuição da hemoglobina na hemácia.

Na forma homozigota da hemoglobinopatia C, em que são comuns cristais de hemoglobina C, observa-se a hemácia em alvo em grande quantidade. Também estão presentes nas associações da hemoglobina C a talassemias, anemia falciforme, anemias hemolíticas, doenças hepáticas com ou sem icterícia, deficiência de ferro pós-esplenectomia e, frequentemente, como artefato devido à confecção inadequada do esfregaço.

Cristal de hemoglobina SC

Nos pacientes heterozigotos, compostos pelas Hb S e Hb C, a síndrome falcêmica tem gravidade variável, podendo se apresentar tanto na forma grave quanto na forma leve (Figura 3.26). Geralmente, o hematócrito destes pacientes varia de 28% a 40%. Eles apresentam uma menor reticulocitose e um número de eritroblastos reduzido em relação aos pacientes portadores da Hb SS. Os achados laboratoriais mais característicos desta hemoglobinopatia são as numerosas hemácias em alvo no esfregaço do sangue periférico e pecilócitos específicos, formados pelos cristais de hemoglobina SC. Estes pecilócitos são densos e apresentam vários graus de curvatura, lembrando as hemácias falciformes. Entretanto, exibem bordas retas e ramificadas, diferenciando-se das hemácias falciformes.

Estomatócito

O estomatócito forma-se quando a pequena área clara no centro da hemácia (biconcavidade) é modificada por uma faixa clara que cruza toda a célula (Figura 3.27). Esta alteração ocorre devido ao aumento de sódio e à diminuição do potássio no interior da hemácia, formando o estomatócito. A morfologia desta hemácia relembra uma "fenda".

Algumas condições clínicas podem estar associadas ao aumento dos estomatócitos no sangue periférico, como: alcoolismo agudo, cirrose hepática e, principalmente, estomatocitose hereditária. O estomatócito também pode surgir em menor quantidade em talassemias menores, contaminação por chumbo e mononucleoses. É muito importante diferenciar o estomatócito de um artefato. Isso porque essa célula está presente em todo o esfregaço enquanto o artefato, em apenas pequenas áreas.

Além do estomatócito com sua morfologia característica, outras formas raras de estoma são observadas no sangue periférico: hemácias com estoma em "Y" e hemácias com estoma transverso. Ocasionalmente, podem formar em um esfregaço de sangue periférico algumas hemácias com essas formas de estoma, porém na maioria dos casos talvez seja artefato na confecção da lâmina.

Hemácia crenada

Hemácias crenadas ou equinócitos são células com projeções espiculares regulares uniformes sobre toda a membrana celular – cerca de 10 a 30 espículos em média (Figura 3.28A). A hemácia crenada também perde a forma discoide e aumenta sua deformabilidade. Isso faz com que a célula aumente sua rigidez, dificultando sua passagem por veias de pequenos calibres e facilitando sua lise. Vários fatores relacionados à área da superfície celular e ao volume da célula podem levar à formação da hemácia crenada.

A transformação equinocítica pode ocorrer em várias formas de hemácias, além das normais, como esferócito-equinócito e eliptócito-equinócito (Figura 3.28B). As principais causas clínicas do surgimento no sangue periférico de hemácias crenadas são: baixa concentração de ácido graxo, tratamento com heparina, uremia, hepatopatias, insuficiência renal, síndrome hemolítica-urêmica, carcinoma gástrico, úlceras pépticas, deficiência de piruvatocinase e fase de compensação do mergulho de grandes profundidades.

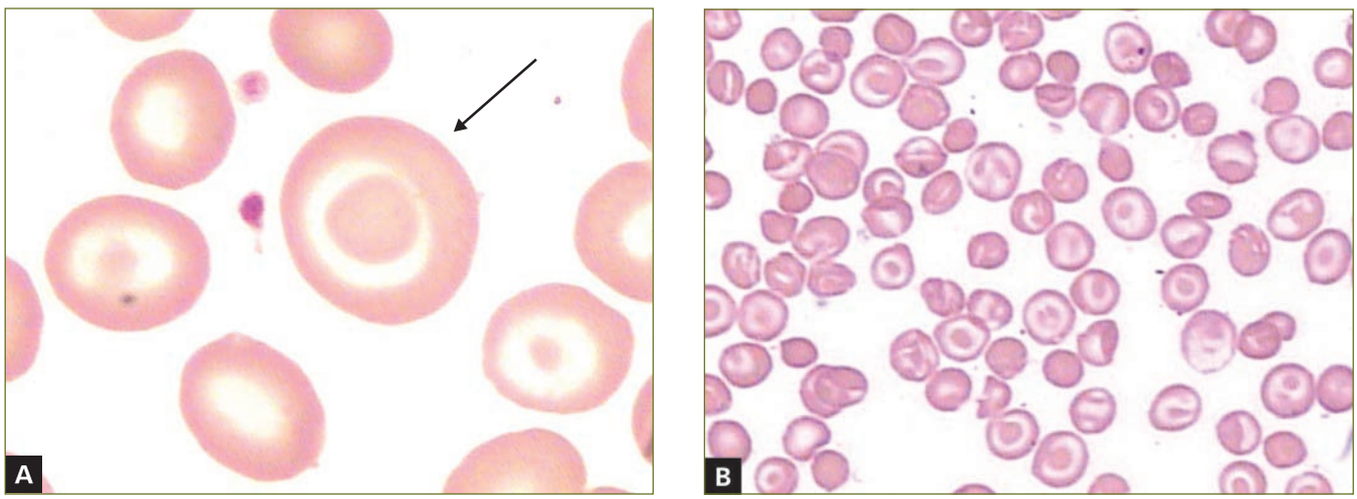


Figura 3.25 (**A** e **B**) Hemácia em alvo (*seta*) (2.000×)

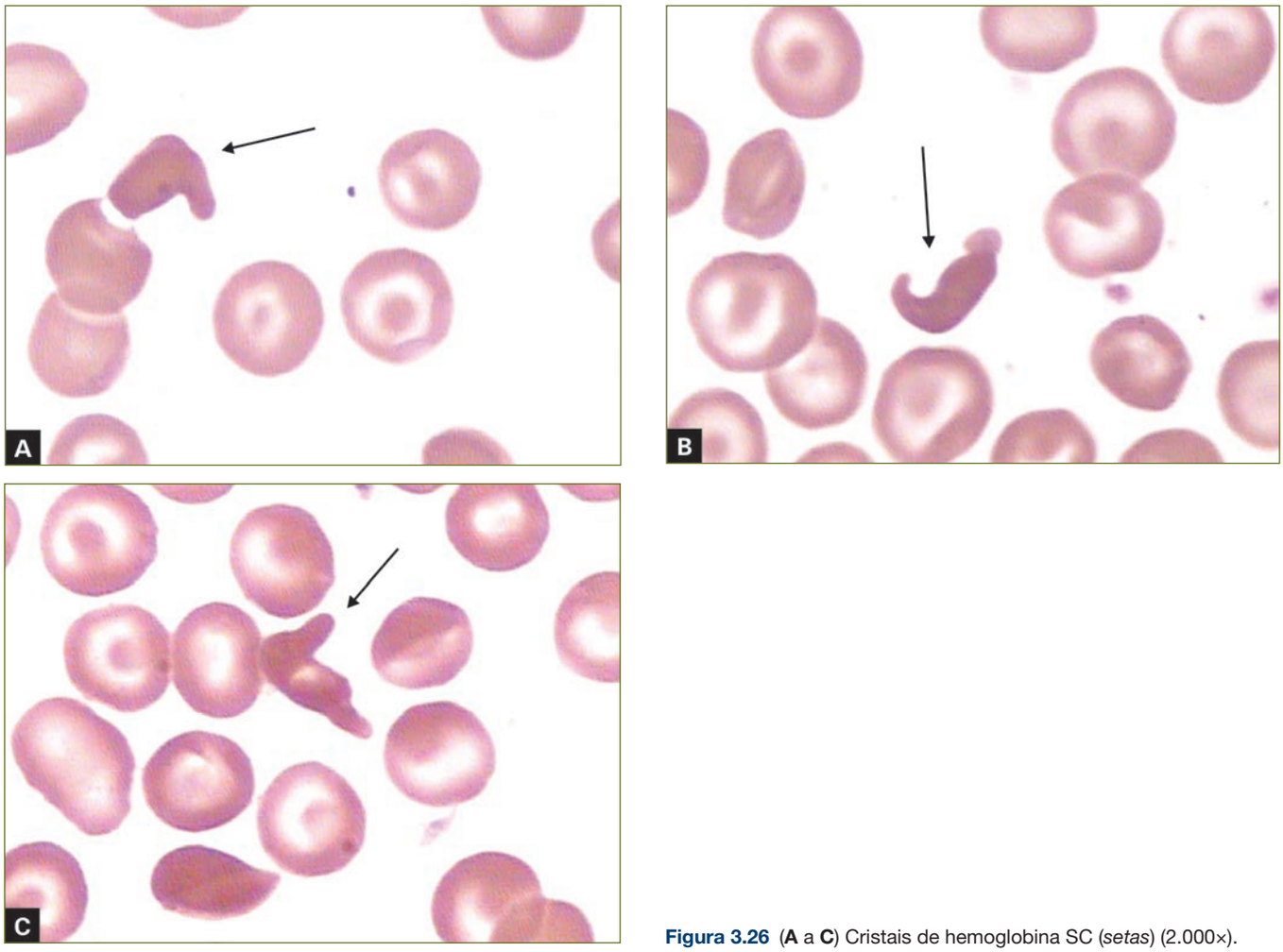


Figura 3.26 (**A** a **C**) Cristais de hemoglobina SC (*setas*) (2.000×).

O uso de corante com pH elevado pode formar artefatos de hemácias semelhantes às hemácias crenadas.

Hemácia pinçada

A hemácia pinçada é um tipo de fragmentação de aspecto entelhado. A forma desta hemácia também se assemelha a um pão. Daí o nome *cottage loaf* (Figura 3.29).

Provavelmente, essa deformação na célula é causada pelo traumatismo mecânico da hemácia com os filamentos de fibrina aderidos na parede dos capilares sanguíneos. É um tipo de hemácia raramente observada e está presente em pequena quantidade nas anemias hemolíticas hereditárias e algumas anemias hemolíticas.

Esferócito

É uma hemácia extremamente compacta com forma esférica e geralmente bastante pequena, em torno de 5 a 6mm (Figura 3.30). No hemograma, quando há esferocitose, existe também um aumento significativo no CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média). Assim, no esfregaço do sangue periférico, os esferócitos destacam-se pela coloração intensa laranja-vermelho, e por não formarem *rouleaux* eritrocitário. Os esferócitos podem ser formados por defeito na espectrina (esferocitose hereditária), por traumatismo físico ou quando a hemácia entra em processo de apoptose.

A perda de parte da membrana celular leva o esferócito a aumentar sua instabilidade, o que o associa à baixa deformabilidade e à destruição prematura da célula.

Na esferocitose adquirida, há danos na membrana celular durante a vida da célula, como aqueles causados por toxina clostídica, veneno ofídico e calor. Já na esferocitose hereditária a hemácia se origina com anormalidades no citoesqueleto (espectrina) com perda de membrana. Os esferócitos podem ser observados em anemias hemolíticas autoimunes por anticorpos quentes, esferocitoses hereditárias, doenças hemolíticas do recém-nascido, sepse por *Clostridium*, picadas de cobra e afogamentos em água doce.

Leptócito

Os leptócitos são hemácias alongadas e delgadas com morfologia semelhante à dos eliptócitos, porém se diferenciam destas células pela hipocromia central associada. Por não existir uma uniformidade celular, por vezes apresentam-se pequenas, finas e dobradas (Figura 3.31).

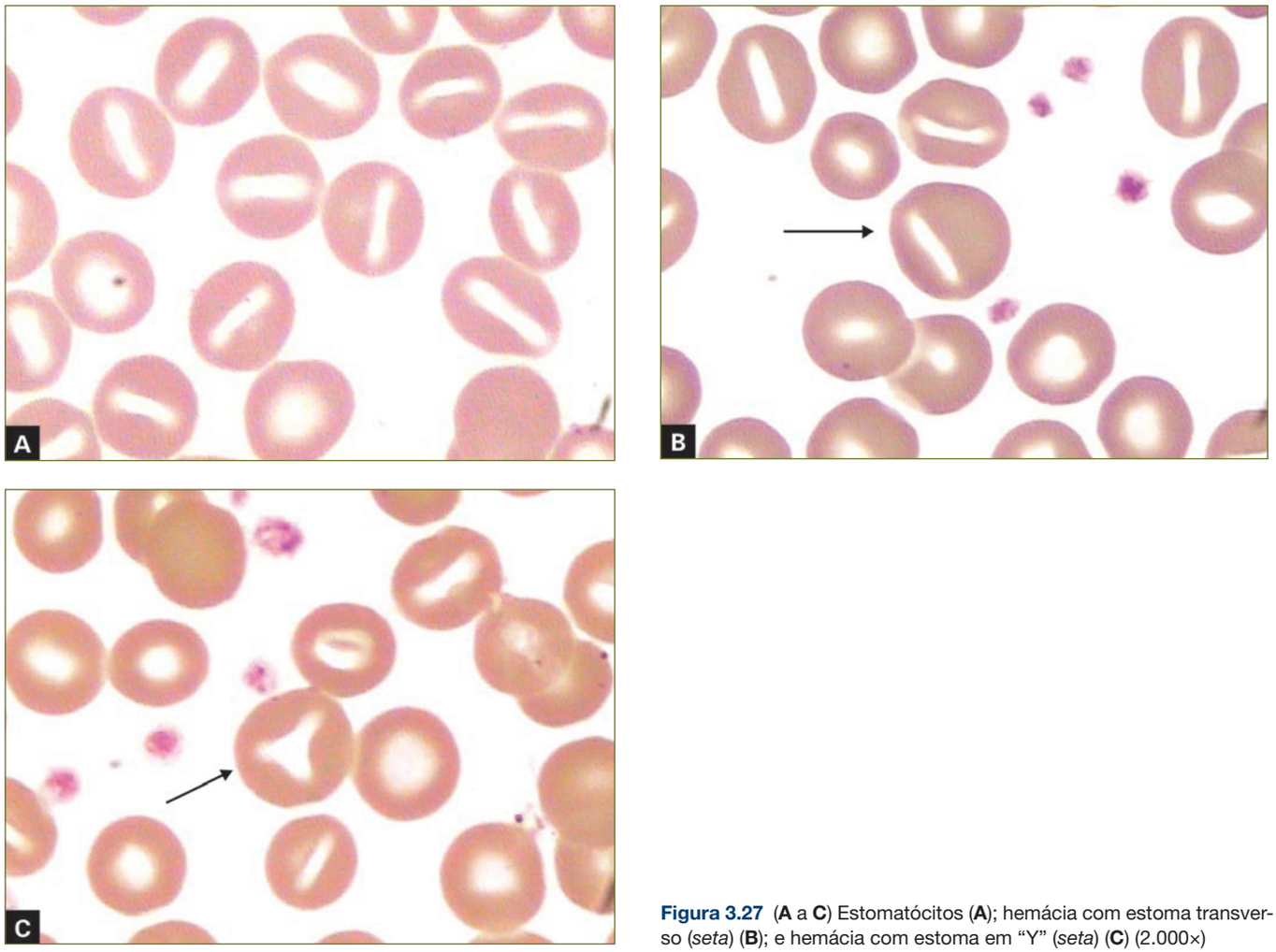


Figura 3.27 (**A** a **C**) Estomatócitos (**A**); hemácia com estoma transverso (*seta*) (**B**); e hemácia com estoma em "Y" (*seta*) (**C**) (2.000×)

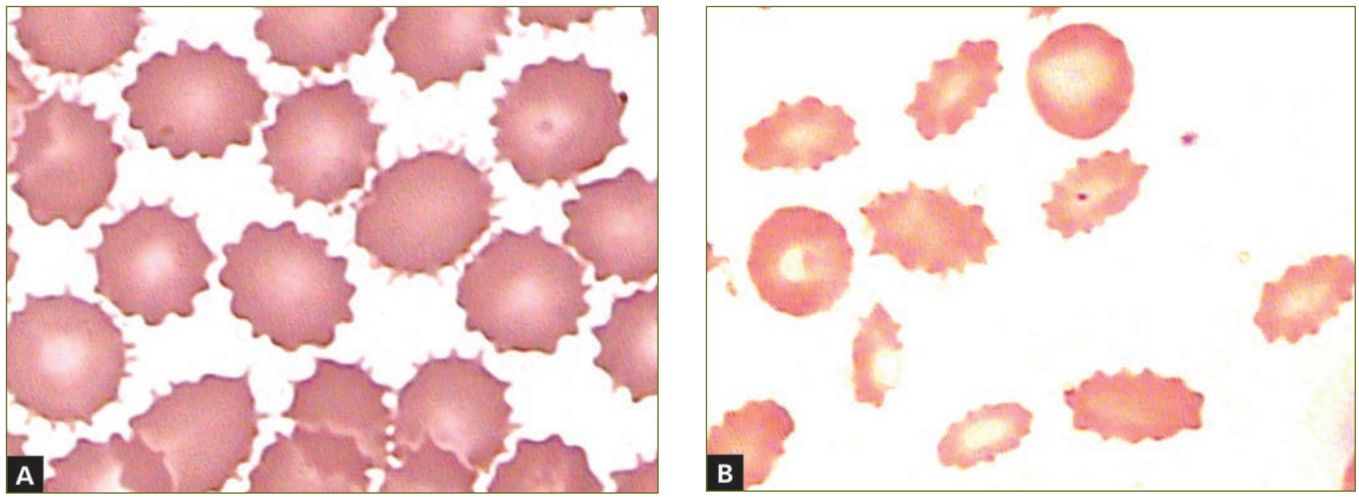


Figura 3.28 (**A** e **B**) Hemácias crenadas (**A**) e eliptócitos-equinócitos (**B**) (2.000×)

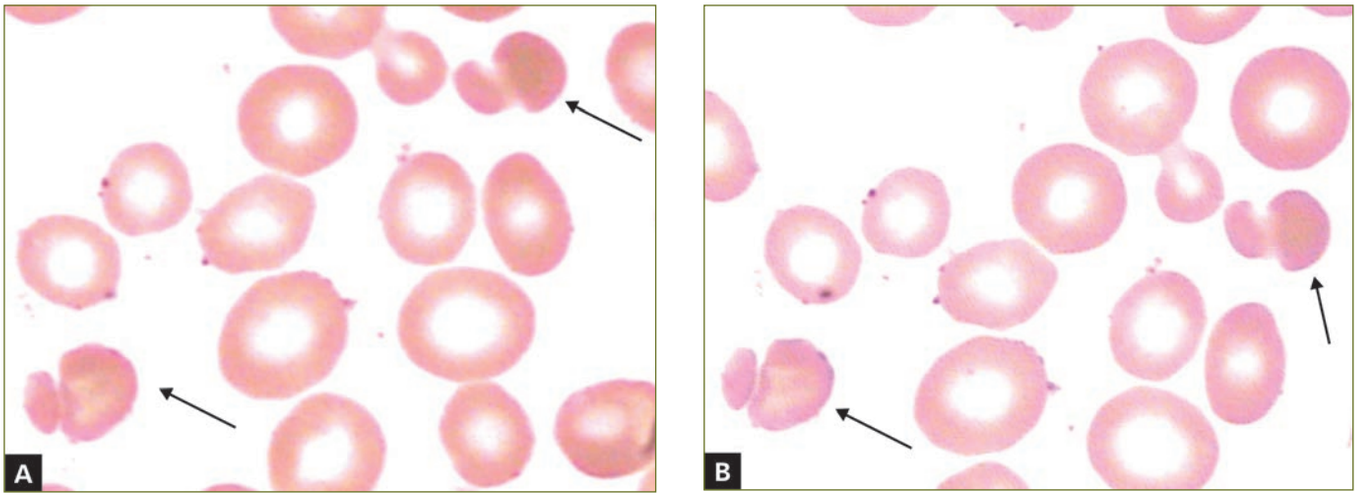


Figura 3.29 (**A** e **B**) Hemácias pinçadas (*setas*) (2.000×)

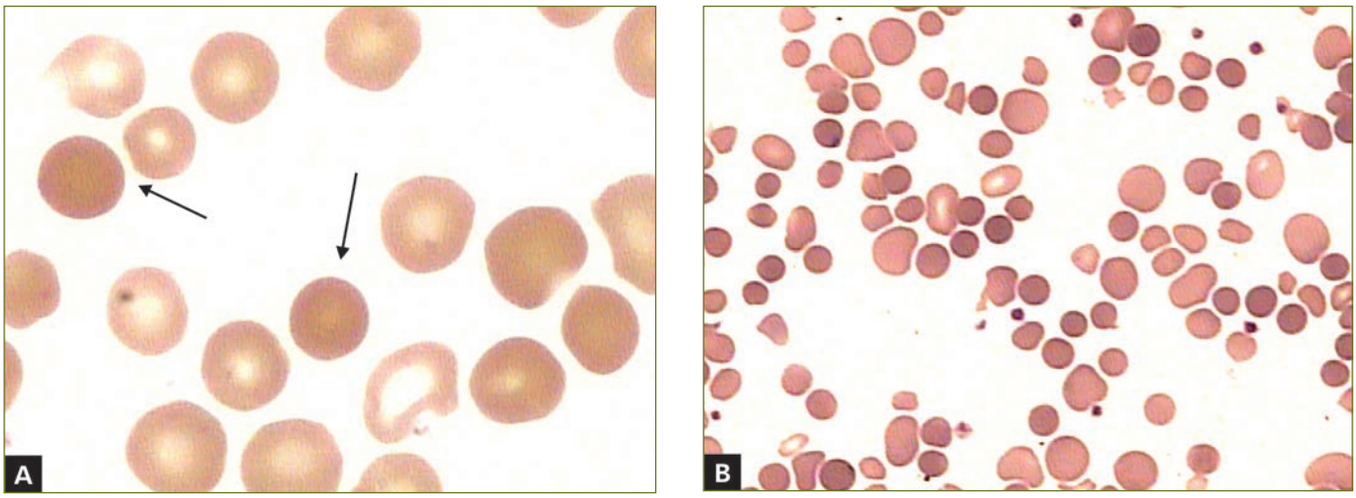


Figura 3.30 (**A** e **B**) Esferócitos (*setas*) (2.000×)

Geralmente, os leptócitos são vistos no esfregaço do sangue periférico em pequena quantidade e podem tomar a forma das outras hemácias em alguns casos. Os leptócitos são mais facilmente encontrados nos pacientes com anemia moderada ou grave por deficiência de ferro e nos portadores de talassemias. Sua formação deve-se à intensa deficiência de componentes da formação da hemácia.

Hemácia em bolha

Nesta hemácia, ocorre formação de bolhas no interior da célula. As bolhas originam-se do resultado da fusão da membrana celular interna da célula, deixando uma área desprovida de hemoglobina. Elas também podem ser formadas a partir da formação de corpúsculos de Heinz nos pacientes portadores da deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PD) (Figura 3.32).

Quando a "bolha" da hemácia se rompe ou é fagocitada pelos macrófagos esplênicos, originam outras formas de hemácias, como queratócitos (hemácias "mordidas") ou esquizócitos.

A hemácia em bolha pode ter um ou mais vacúolos (bolhas) e também ser vista nas embolias pulmonares, anemias microangiopáticas, anemias falciformes e, raramente, em outras anemias.

Queratócito

O queratócito é também conhecido como hemácia mordida. Os ceratócitos são hemácias com um ou mais pares de espículos (Figura 3.33). São células que se originam de uma ou mais "mordidas" de macrófagos esplênicos ou por dano celular traumático. A ruptura de um ou mais vacúolos, no interior da hemácia (hemácia em bolha), também originam queratócitos.

Esse tipo de célula é observado, principalmente, nas anemias hemolíticas por hemoglobina instável com formação de corpos de Heinz, em pacientes portadores de defeito enzimático eritrocitário. São exemplos a anemia por deficiência de G-6-PD, a anemia hemolítica microangiopática e as nefropatias pós-transplantes.

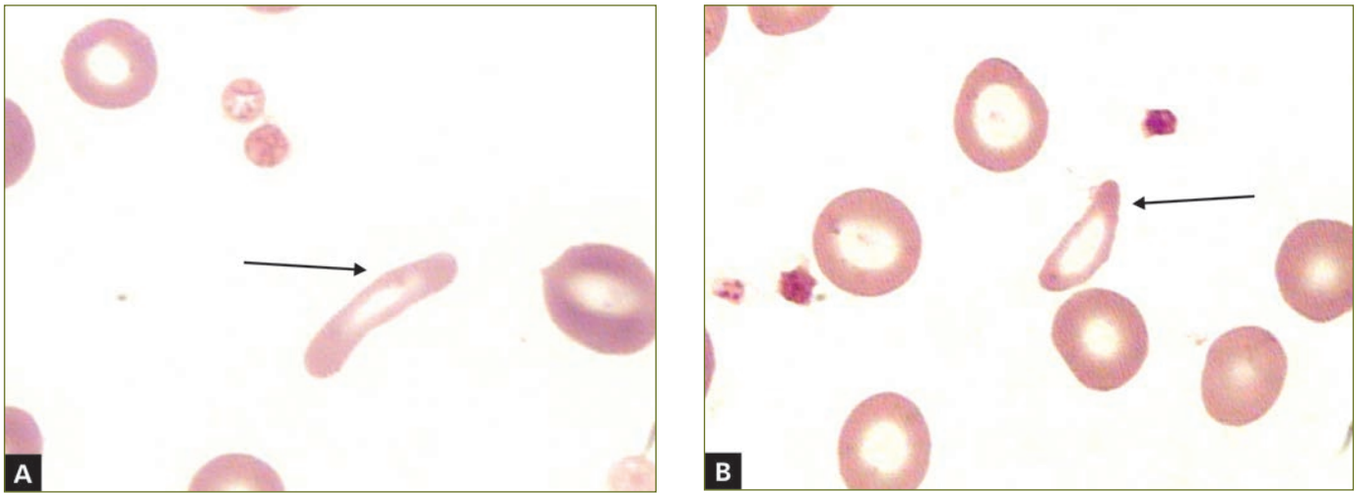


Figura 3.31 (**A** e **B**) Leptócitos (*setas*) (2.000×)

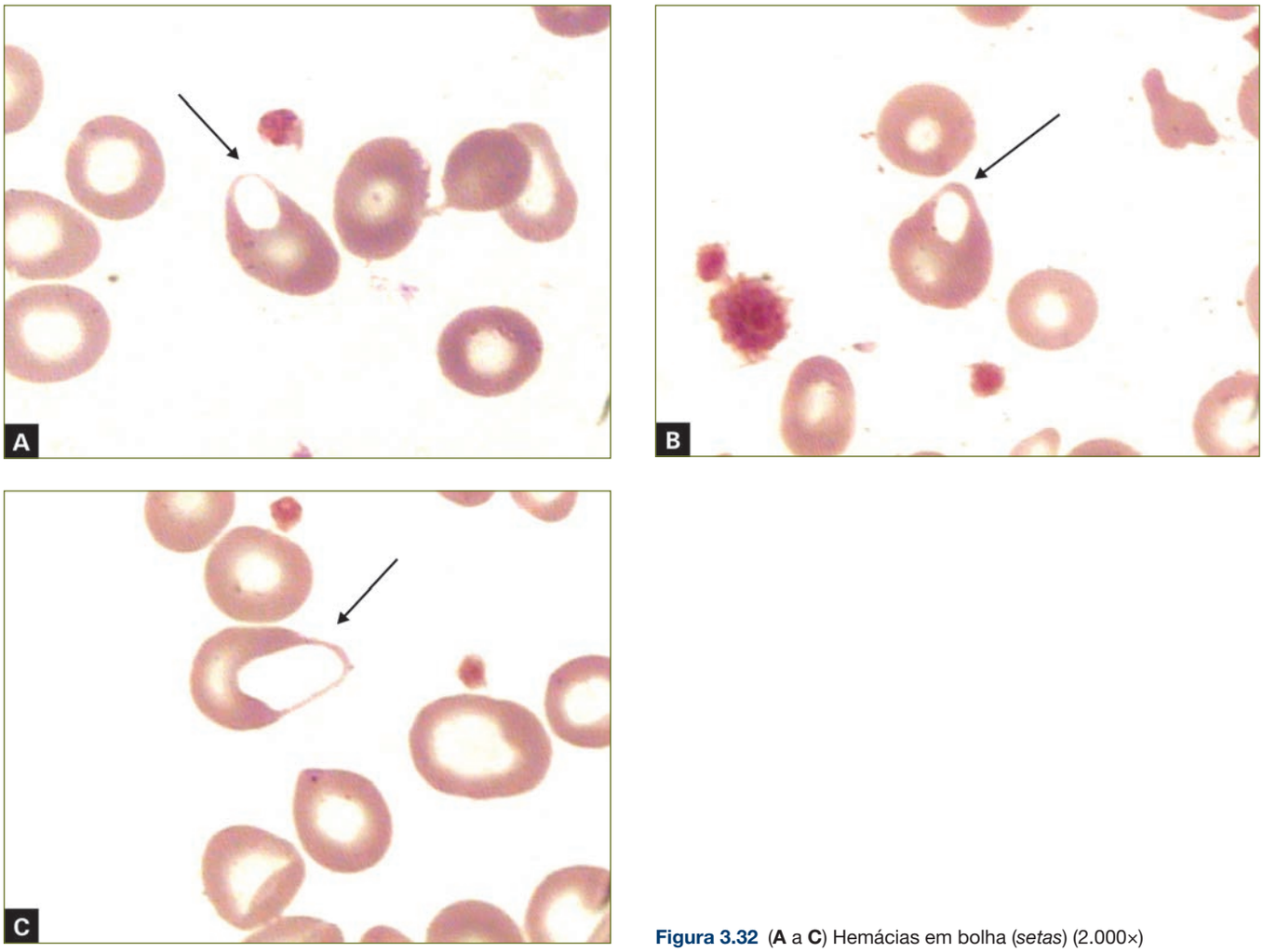


Figura 3.32 (**A** a **C**) Hemácias em bolha (*setas*) (2.000×)

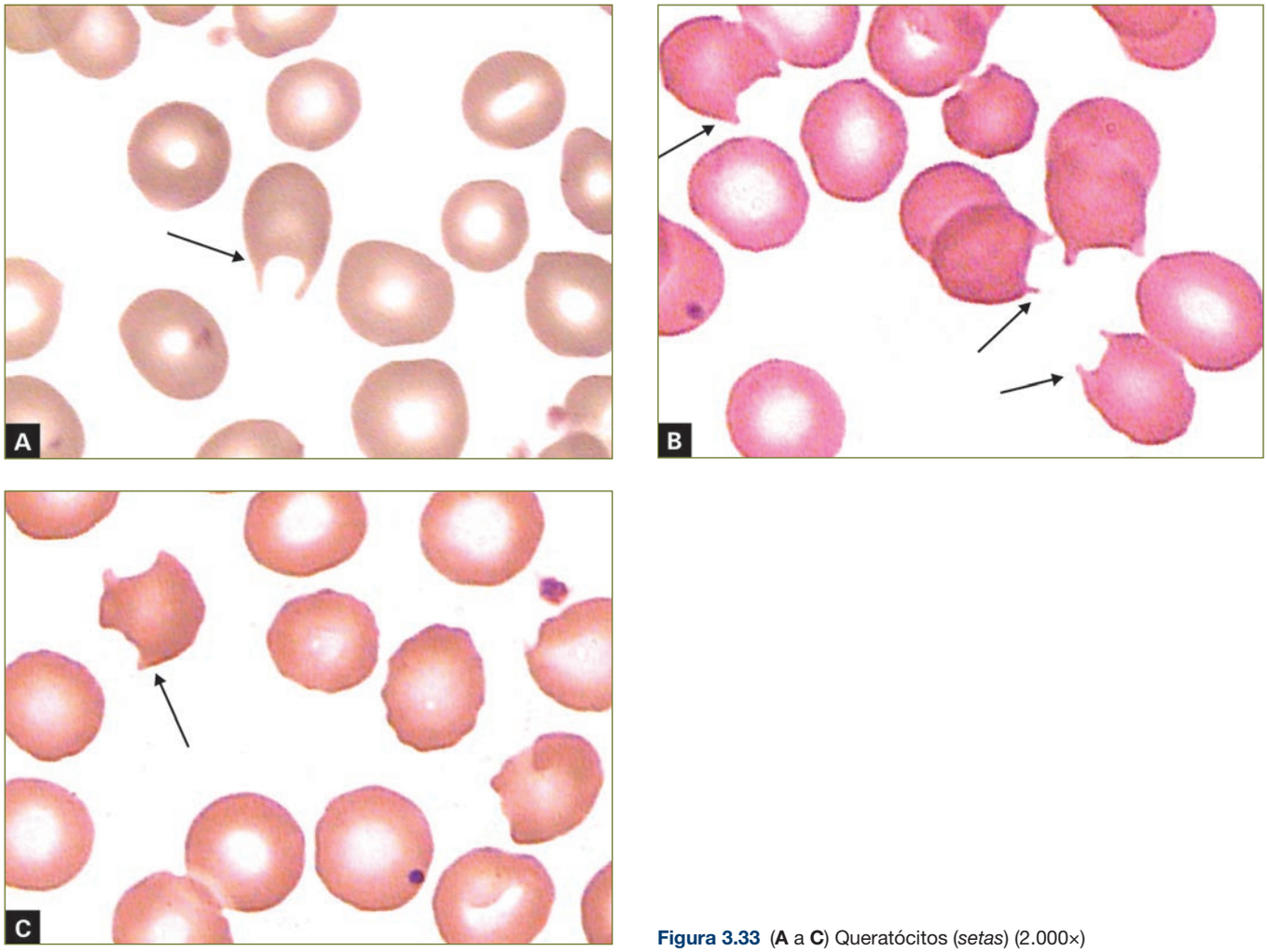


Figura 3.33 (**A** a **C**) Queratócitos (*setas*) (2.000×)

Hemácia irregularmente contraída

As hemácias irregularmente contraídas são mais densas e menores que as hemácias normais e não apresentam a palidez central. Como são células irregulares, estas hemácias diferenciam-se dos esferócitos, que são bastante redondos (Figura 3.34).

Tais células são produzidas quando há dano oxidativo na hemácia ou formação de precipitados de hemoglobina instável (corpos de Heinz) aderidas na membrana celular. É comum algumas hemácias irregularmente contraídas perderem essas inclusões de membrana por fagocitose dos macrófagos esplênicos, deixando a célula com aspecto similar ao esférocito.

As hemácias irregularmente contraídas podem surgir em grande quantidade no sangue periférico dos pacientes portadores de hemoglobina C, C/betatalassemia, hemoglobina S/C, hemoglobinas instáveis, hemólises agudas e deficiência de G-6-PD. Em pequena quantidade ou raras, podem ser vistas em episódios hemolíticos menores, pacientes portadores de hemoglobinas H, E, betatalassemia menor, traços de hemoglobina C e xerocitose.

Picnócito

Picnócito, ou dagmácito, é uma forma de hemácia que tem a hemoglobina retraída para as laterais da célula, deixando a área central da célula vazia sem hemoglobina. Geralmente, o picnócito é uma célula alongada (Figura 3.35).

É importante a diferenciação entre o picnócito e algumas formas de hemácias mordidas e também com cristais de hemoglobina C. Isso porque suas origens são distintas. Trata-se de uma célula de baixa ocorrência, mas pode surgir nos pacientes com deficiência de G-6-PD, anemia hemolítica intravascular, anemia microangiopática e anemias hemolíticas graves e na deficiência hereditária de lipoproteínas.

Hemácia borrada

As hemácias borradas são células que perderam a definição do contorno da membrana celular, ficando com aparência imprecisa e deformada (Figura 3.36). Este tipo de fenômeno não é incomum, já que pacientes com altas taxas de lipídios (hiperlipidemia), mais precisamente com dosagem bioquímica de triglicerídeos superiores a 1.000mg/dL no soro, apresentam

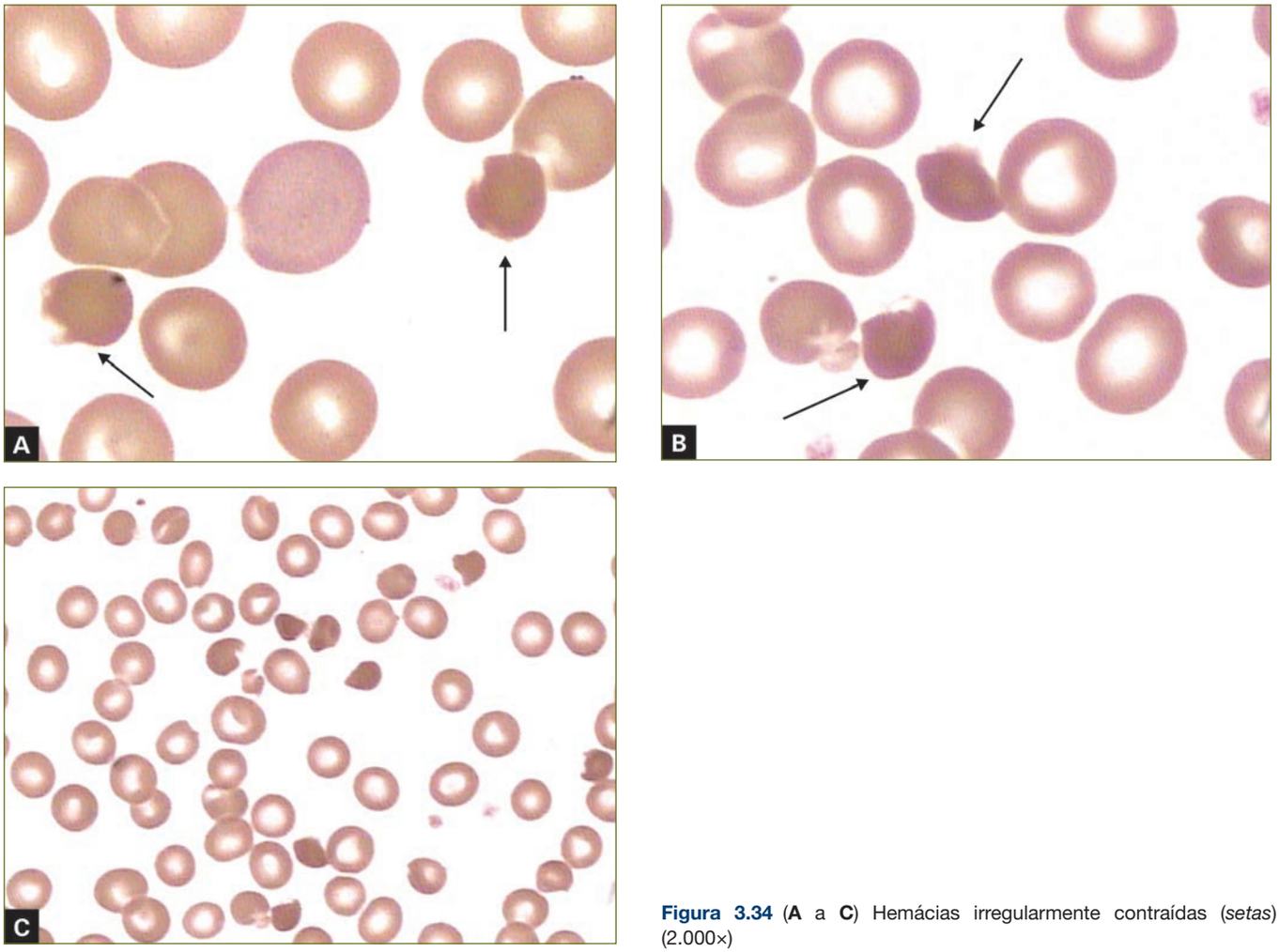


Figura 3.34 (**A** a **C**) Hemácias irregularmente contraídas (*setas*) (2.000×)

estas células no esfregaço do sangue periférico. A origem desta hemácia deve-se ao excesso de lipídios, que prejudica o equilíbrio da composição da membrana da hemácia, que é lipoproteica.

É importante diferenciar a hemácia borrada da formação de artefatos similares, confirmando a existência com a dosagem de triglicerídeos para confirmar.

Knizócito

O knizócito é uma hemácia que apresenta no seu interior duas áreas laterais claras e alongadas, decorrentes de sua deformidade (Figura 3.37). Ele é encontrado raramente no esfregaço do sangue periférico de pacientes com anemias hemolíticas, esferocitose hereditária e, principalmente, na pancreatite.

Na literatura inglesa, o knizócito é denominado *pinch-cell*, que significa célula beliscada ou apertada – analogia com a deformação celular. O mais curioso sobre os knizócitos é o surgimento dessas células no sangue dos astronautas após 20 a 30 dias depois do lançamento ao espaço, as quais desaparecem 3 meses após a chegada.

Xerócito

É a forma variante desidratada do estomatócito, também denominado excentrócito. Na literatura inglesa, é conhecido como *puddled*, que significa em português "turvado".

O xerócito é uma hemácia em que sua biconcavidade localiza-se na periferia da célula, ou excêntrica (Figura 3.38). Na xerocitose hereditária, é comum surgirem várias formas de pecilócitos no esfregaço do sangue periférico – entre elas, o xerócito.

Hemácia em broto

A hemácia em broto é um artefato visto no esfregaço do sangue periférico de um material (tubo de sangue com anticoagulante EDTA) submetido a um aumento na temperatura superior a 50°C em média. Geralmente, isso ocorre no transporte e no armazenamento do material.

Em geral, surgem vários brotos aderidos à hemácia ou livre entre as células. São observados ainda alguns fragmentos de hemácias. Normalmente, o material apresenta algum grau de hemólise (Figura 3.39).

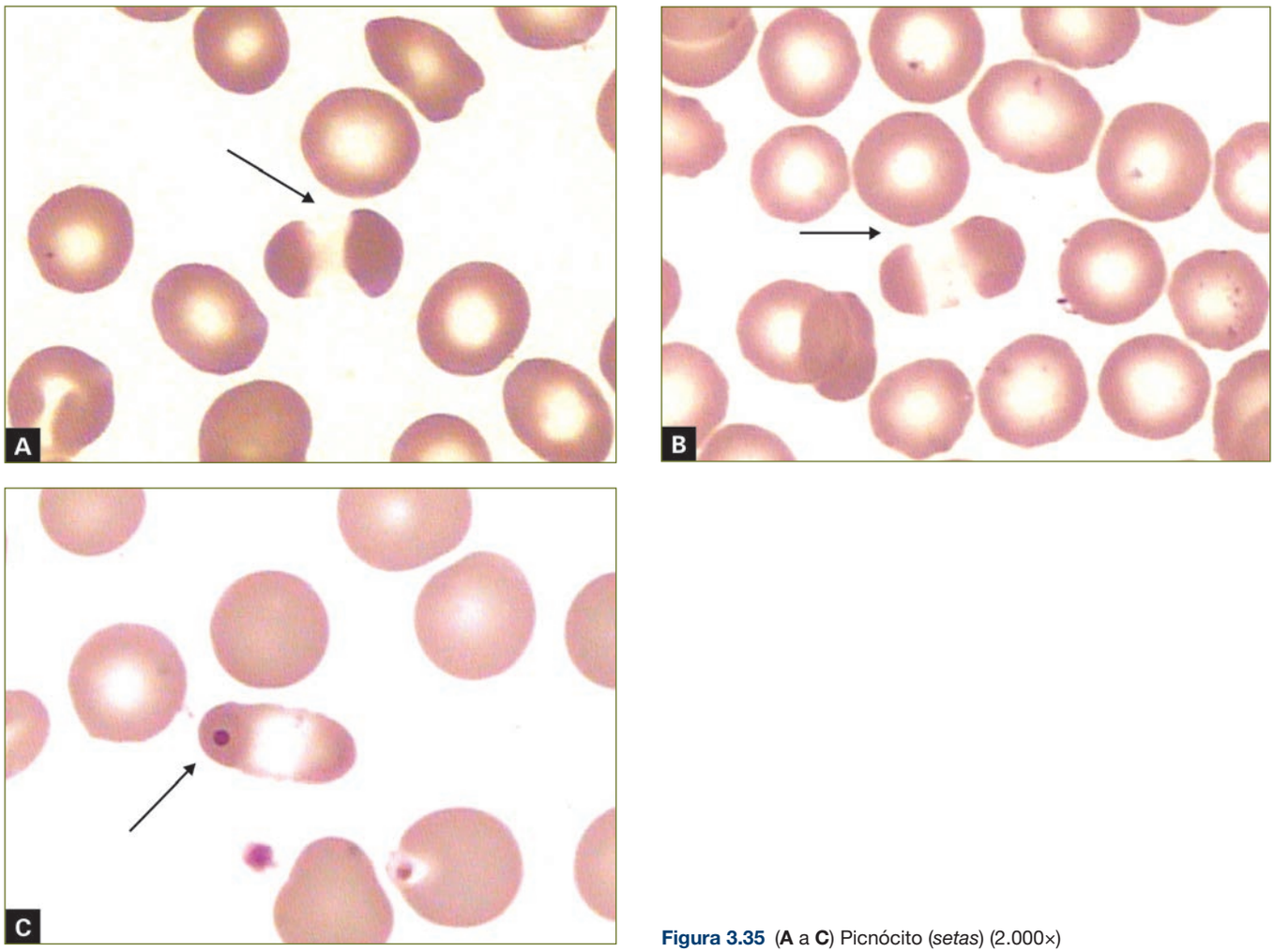


Figura 3.35 (**A** a **C**) Picnócito (*setas*) (2.000×)

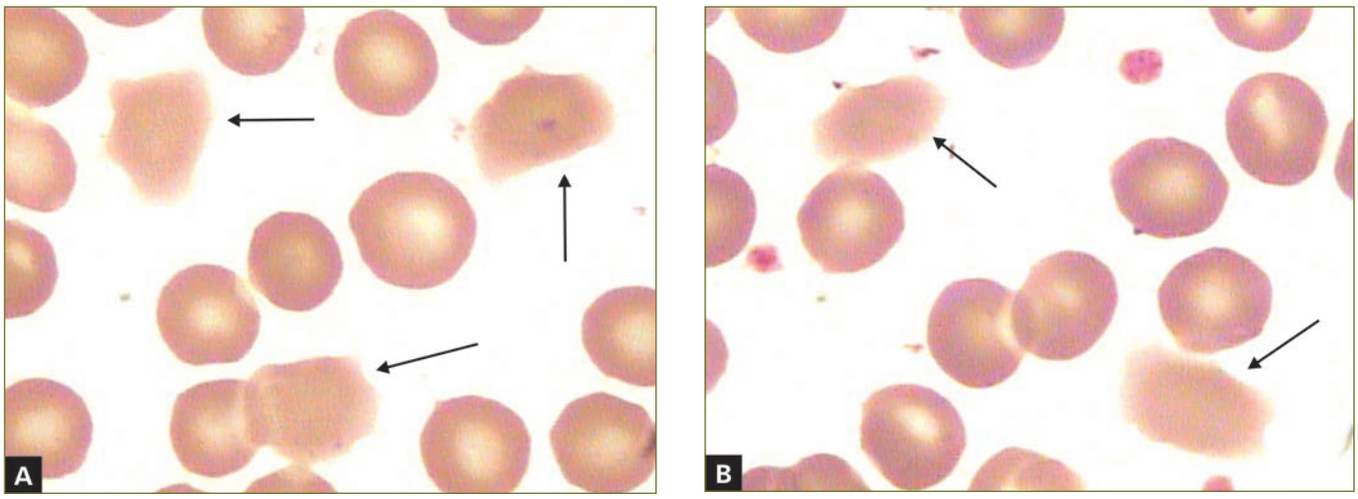


Figura 3.36 (**A** a **B**) Hemácias borradas (*setas*) (2.000×)

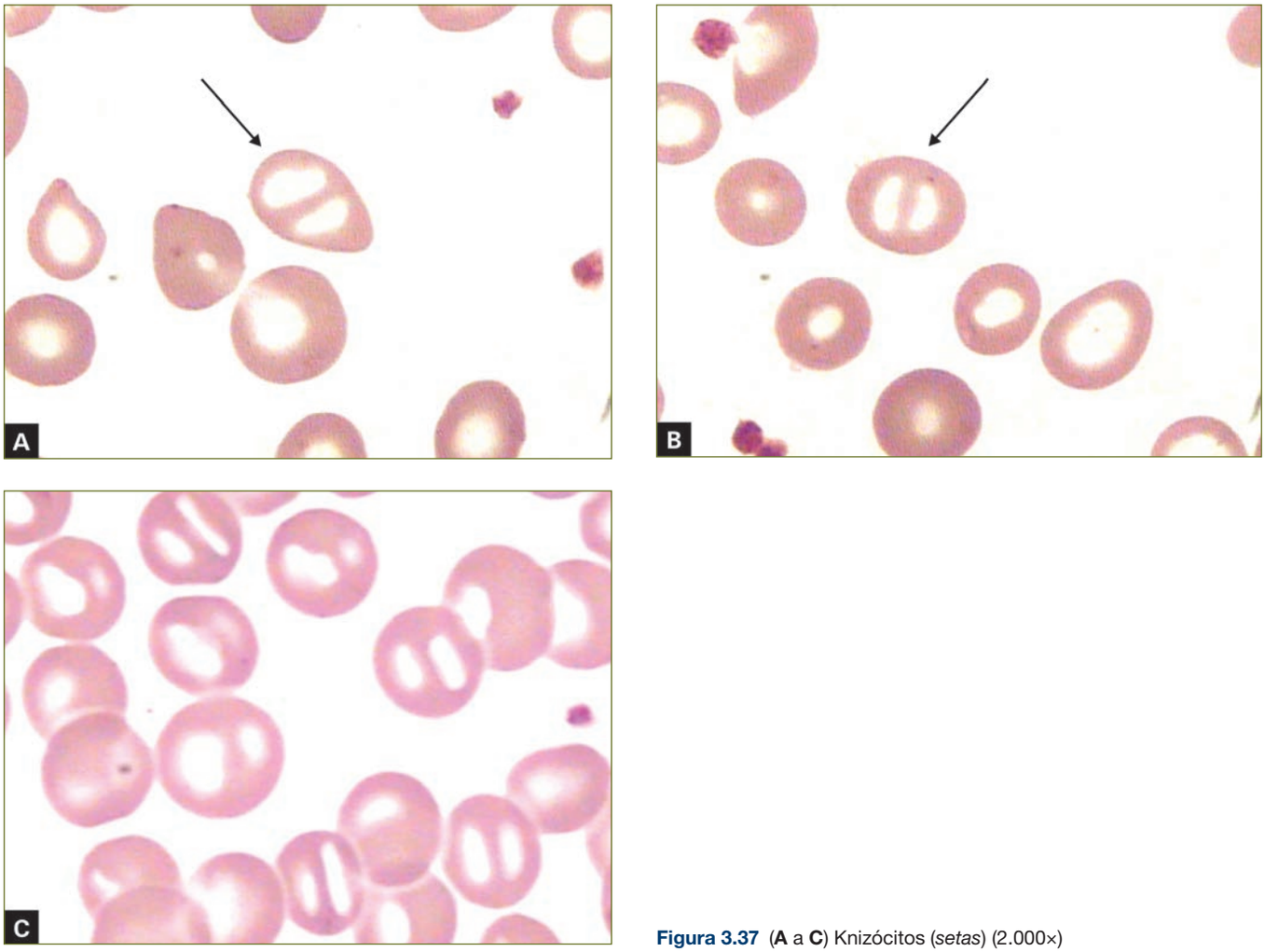


Figura 3.37 (**A** a **C**) Knizócitos (*setas*) (2.000×)

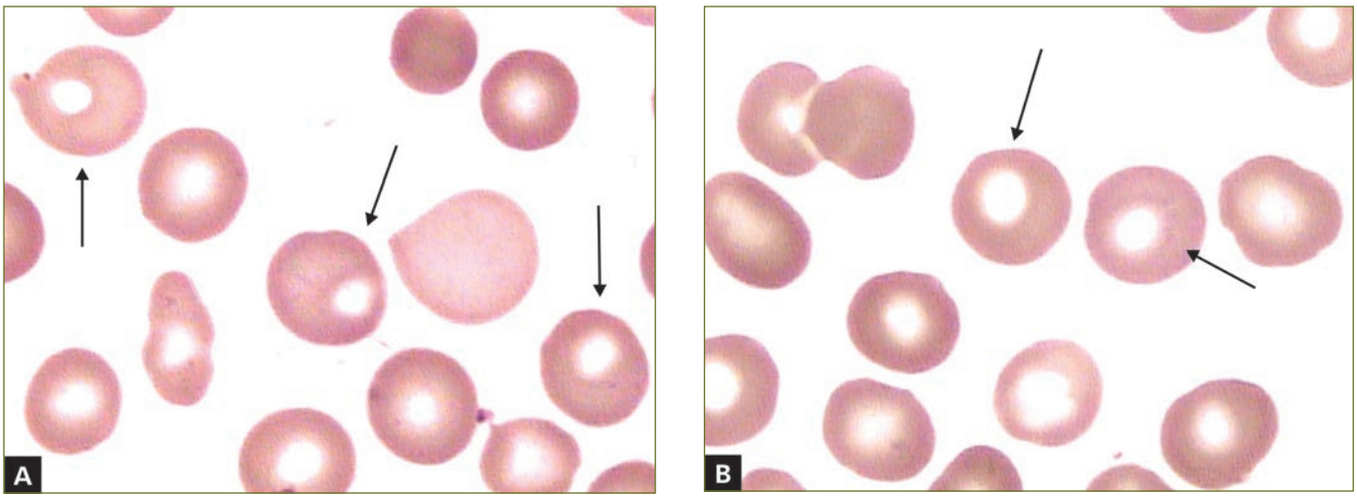


Figura 3.38 (**A** a **B**) Xerócitos (*setas*) (2.000×)

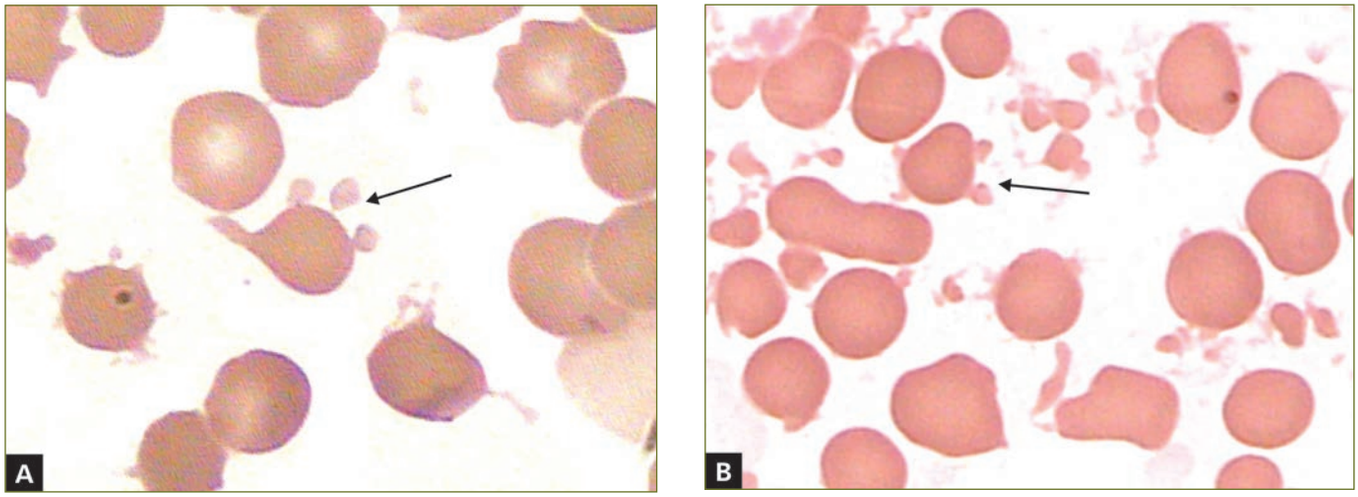


Figura 3.39 (**A** a **B**) Hemácias em broto (*setas*) (2.000×)

Hemácia crescente

Hemácia crescente é um artefato que ocorre com mais frequência em pacientes que apresentam anemia. Este pecilócito com forma de lua crescente é gerado a partir do rompimento da hemácia e geralmente observado ao final do esfregaço sanguíneo em um tom mais claro que a hemácia normal (Figura 3.40).

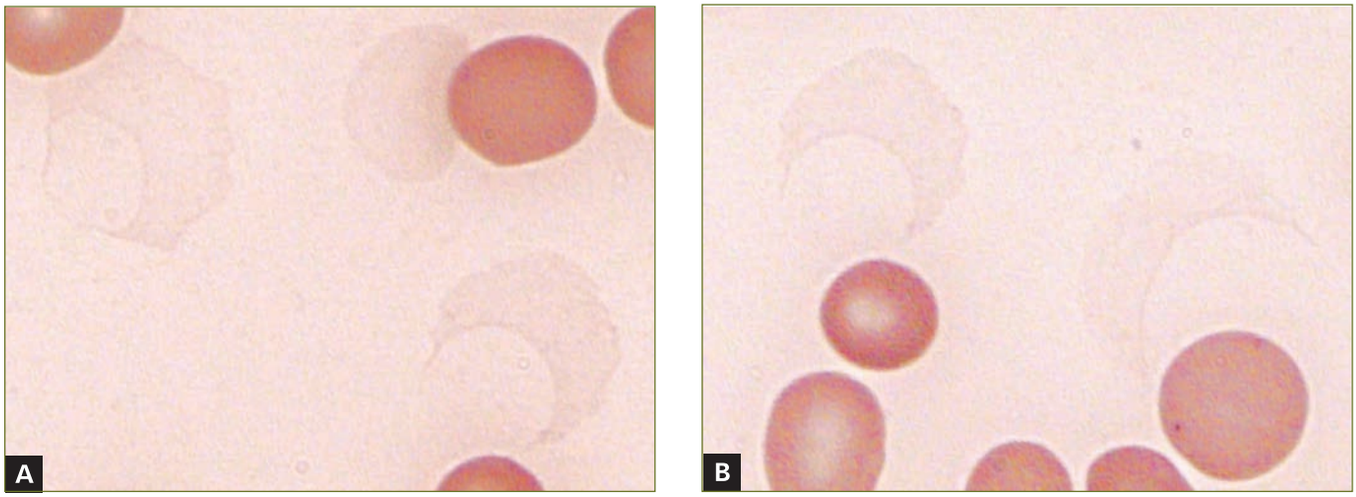


Figura 3.40 (**A** e **B**) Hemácia crescente

Outras formas de pecilócitos menos frequentes (Figura 3.41)

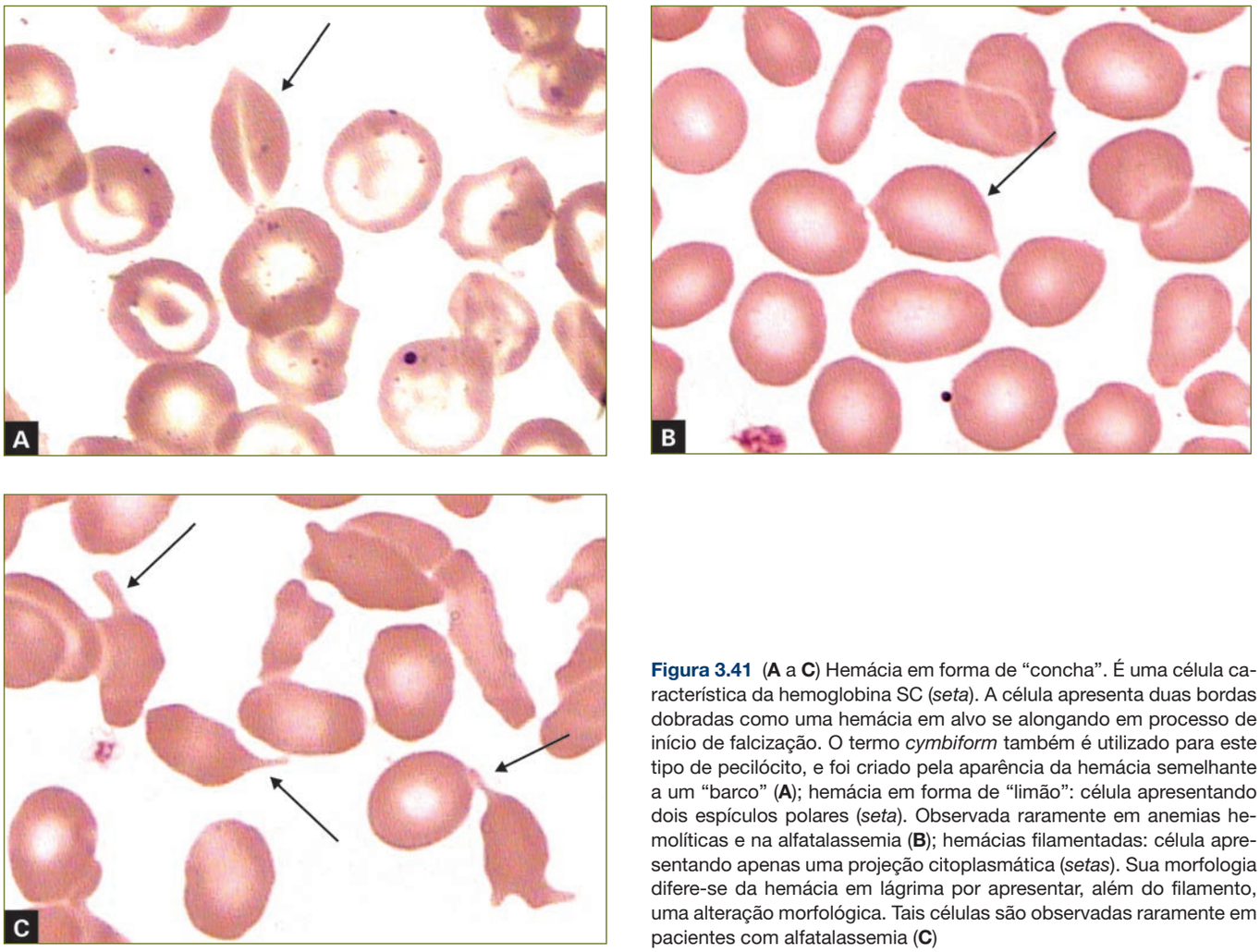


Figura 3.41 (**A** a **C**) Hemácia em forma de "concha". É uma célula característica da hemoglobina SC (*seta*). A célula apresenta duas bordas dobradas como uma hemácia em alvo se alongando em processo de início de falcização. O termo *cymbiform* também é utilizado para este tipo de pecilócito, e foi criado pela aparência da hemácia semelhante a um "barco" (**A**); hemácia em forma de "limão": célula apresentando dois espículos polares (*seta*). Observada raramente em anemias hemolíticas e na alfatalassemia (**B**); hemácias filamentadas: célula apresentando apenas uma projeção citoplasmática (*setas*). Sua morfologia difere-se da hemácia em lágrima por apresentar, além do filamento, uma alteração morfológica. Tais células são observadas raramente em pacientes com alfatalassemia (**C**)

INCLUSÕES NAS HEMÁCIAS

Corpúsculo de Howell-Jolly

É um fragmento de material nuclear, formado por um cromossomo que se separou do fuso mitótico em uma expressão nuclear incompleta, durante uma mitose anormal (Figura 3.42). Na hemácia, o corpúsculo de Howell-Jolly apresenta-se como uma inclusão arredondada com 1 a 2μ de diâmetro e de coloração semelhante ao do núcleo.

Em pacientes esplenectomisados, hipoesplênicos e recém-nascidos que o baço ainda está imaturo, os corpúsculos de Howell-Jolly são bem mais frequentes. Isso porque é no baço que ocorre a remoção. Na anemia megaloblástica, nas anemias hemolíticas e também no alcoolismo intenso são frequentes esses corpúsculos. Na medula óssea, os corpúsculos de Howell-Jolly aparecem em indivíduos normais, podendo se apresentar nas hemácias e nos eritroblastros.

Anel de Cabot

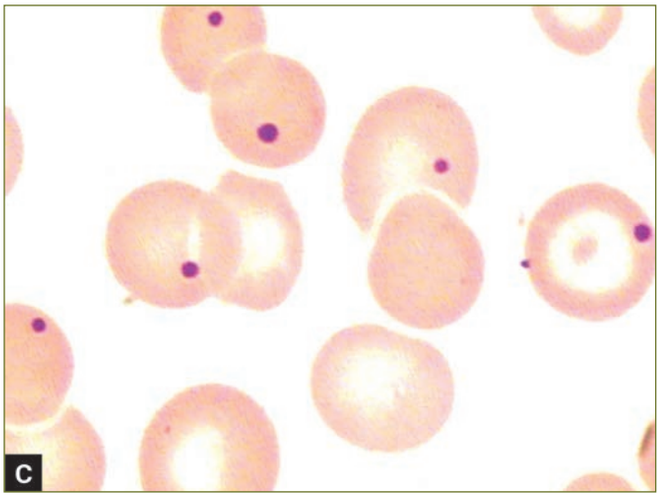
Restos de microtúbulos remanescentes do fuso mitótico durante a divisão celular formam o anel de Cabot . Até há pouco tempo, acreditava-se que o anel de Cabot consistia em "restos de membrana celular".

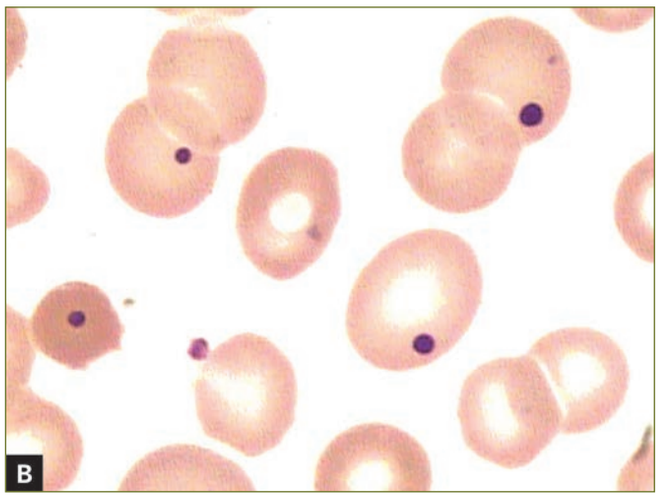
Apresenta-se com a forma em "anel", em "oito" e no esfregaço do sangue periférico. Além disso, cora-se de vermelho-roxo e não tem estrutura interna (Figura 3.43). Em alguns casos raros, apresenta-se duplo, na mesma hemácia.

Nas anemias graves, na anemia perniciosa, na talassemia beta maior, na contaminação com chumbo, na deseritropoese e em pacientes com síndrome mielodisplásica, o anel de Cabot é mais propenso a surgir.

Pontilhado basófilo

O pontilhado basófilo é composto de um agregado de ribossomos e RNA, que se precipitam na coloração do esfregaço do





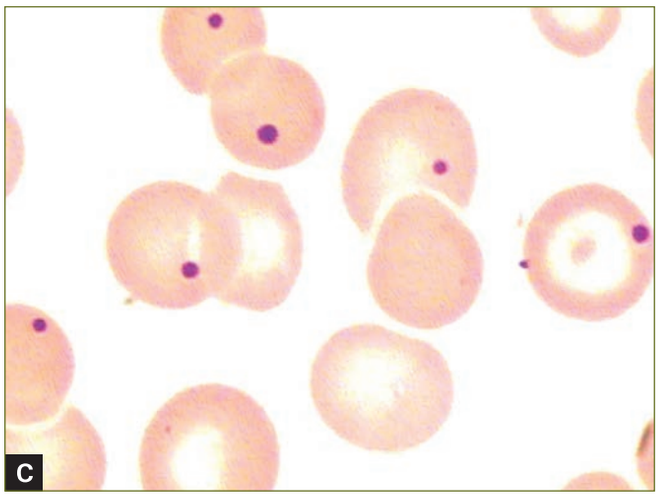
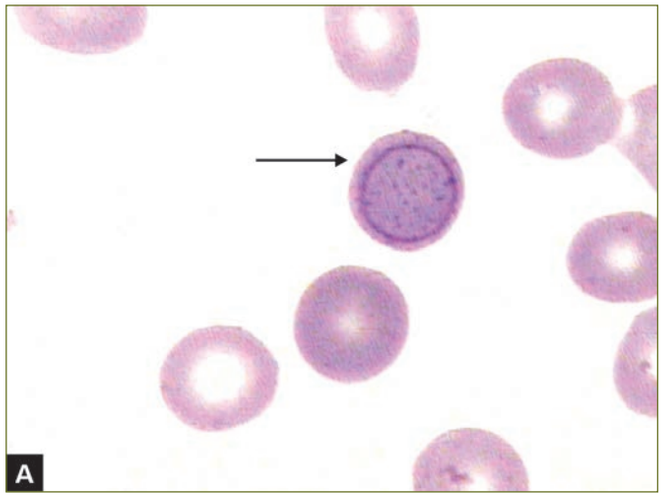
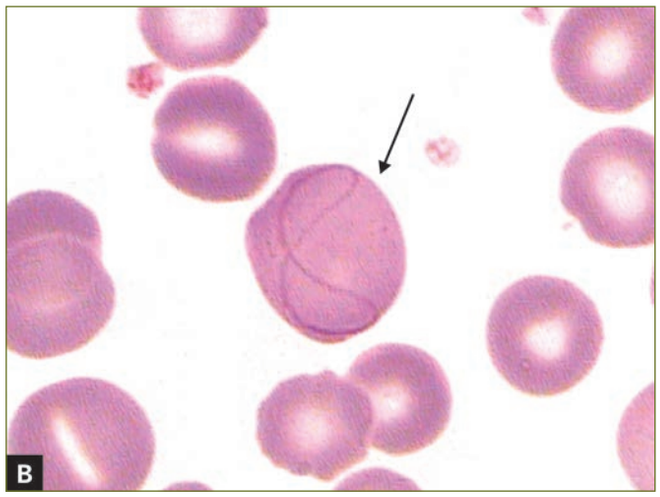


Figura 3.42 (**A** a **C**) Corpúsculos de Howell-Jolly (2.000×)





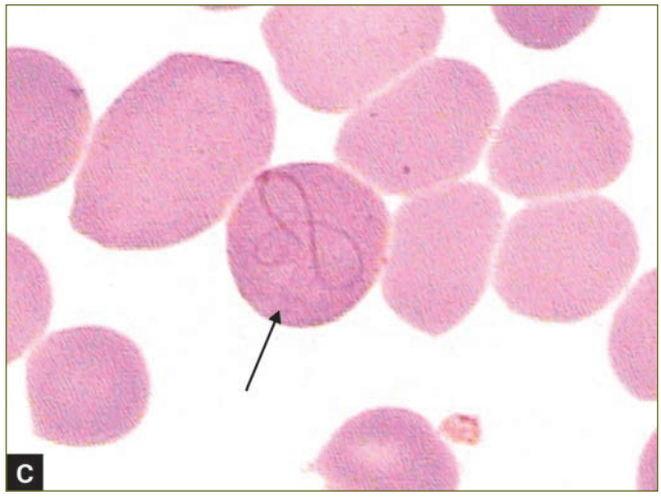


Figura 3.43 (**A** a **C**) Anel de Cabot. Forma em "anel" (*seta*) (**A**); em "oito" (*seta*) (**B**); sem forma definida (*seta*) (**C**) (2.000×)

sangue periférico, além de pequenos agregados de mitocôndrias e siderossomos. São grânulos azul-escuros geralmente finos, distribuídos no interior da hemácia (Figura 3.44).

O pontilhado basófilo está associado clinicamente a distúrbios na eritropoese – mais precisamente, um defeito na síntese de "heme". É visto raramente em pacientes normais, e em quantidade moderada nos portadores de talassemia beta menor e maior e anemia megaloblástica e em pacientes portadores de hemoglobina instável. Ocorre um aumento evidente de pontilhado basófilo em pacientes portadores da deficiência de pirimidina 5' nucleotidase (enzima necessária para degradação do RNA). Isso pode ser visto também na contaminação com o chumbo, pois este inibe tal enzima.

Corpúsculos de Heinz

Os corpúsculos, ou corpos, de Heinz são partículas de polipeptídios originadas da desnaturação da hemoglobina oxidada, podendo alcançar 1μ de tamanho (Figura 3.45). A formação dos corpúsculos de Heinz depende de uma série de reações oxidantes, que se inicia pela transformação da oxiemoglobina em metaemoglobina. O aumento desta última induz a enzima metaemoglobina redutase a gerar um desequilíbrio entre a oxi- e a metaemoglobina, produzindo subprodutos (hemicromos) que fazem perder o grupo "heme". Os subprodutos de globina desprovida do grupo "heme" precipitam-se sob forma de corpúsculos de Heinz e aderem-se na proteína de membrana "banda 3" da hemácia, promovendo uma oxidação e sinalizando para o reconhecimento imunológico dos macrófagos. Isso leva à fagocitose da inclusão, dando origem às células:

- Hemácias em bolha.
- Hemácias mordidas.
- Esquizócitos.

Os pacientes que fizeram esplenectomia e aqueles portadores da deficiência de G-6-PD quando em uso de medicações do tipo sulfonamidas (dapzona) desenvolvem a formação evidente de corpúsculos de Heinz. Uma das maiores características das hemoglobinas instáveis é o aumento moderado dos corpúsculos de Heinz nas hemácias. Os corpúsculos de Heinz podem ser únicos ou vários na mesma hemácia.

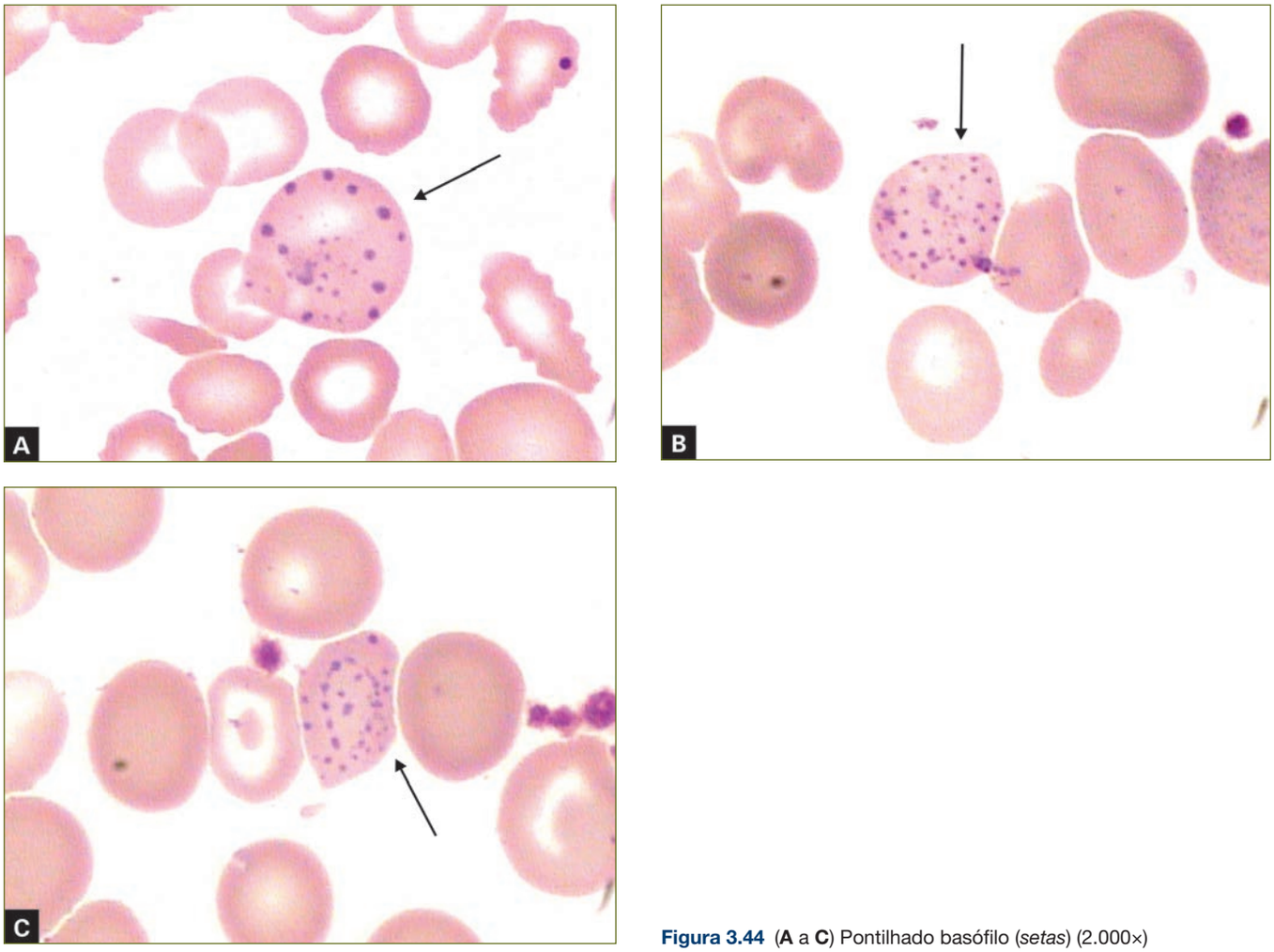


Figura 3.44 (**A** a **C**) Pontilhado basófilo (*setas*) (2.000×)

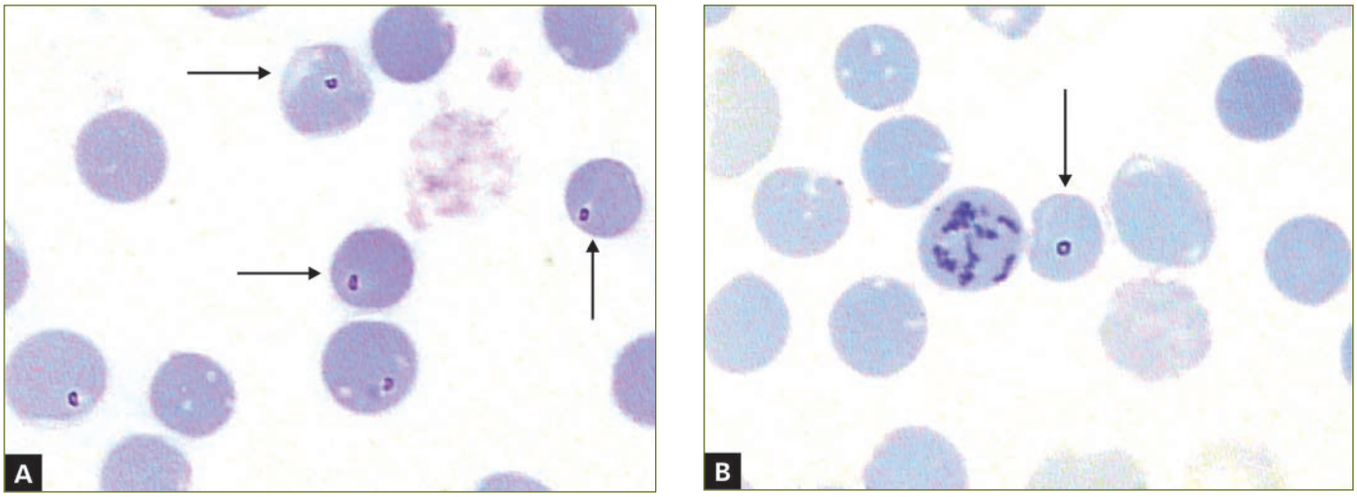


Figura 3.45 (**A** e **B**) Corpúsculos de Heinz (*setas*) (2.000×)

Corpúsculos de Pappenheimer – siderócitos

São pequenas inclusões irregulares, que se localizam na periferia da hemácia, representando mitocôndrias e ribossomos carregados de ferro, agregados de ferritina, ou fagossomos que contêm ferritina agregada (Figura 3.46). O eritroblasto ortocromático, o reticulócito e a hemácia podem apresentar um ou mais corpúsculos de Pappenheimer.

Os corpúsculos de Pappenheimer são tingidos pelo corante Romanowsky, com o qual a hemossiderina aparece como pequenos grânulos azuis. Entretanto, quando corados pela reação de Perls para o ferro (azul da Prússia), os pequenos grânulos são chamados de siderossomos e a hemácia, de siderócito. Esta última coloração é utilizada principalmente para esfregaços de medula óssea, mas no sangue periférico pode servir para identificar siderócitos e sideroblastos. Em pacientes esplenectomizados, é normal o aumento de corpúsculos de Pappenheimer, já que é o baço que faz sua retirada. Também se observa esse aumento na síndrome mielodisplásica, na anemia sideroblástica, no alcoolismo, na anemia deseritropoética e na toxicidade por isoniazida.

Siderócito é uma hemácia com uma quantidade alta de ferro no seu interior e, por isso, apresenta corpúsculos de Pappenheimer. É uma célula raramente presente no sangue periférico de pacientes normais.

Cristal de hemoglobina C

A hemoglobina C é uma variante da hemoglobina A que se originou da substituição do aminoácido ácido glutâmico por uma lisina, na cadeia beta da globina. Em geral, pacientes com homozigose de hemoglobina C (Hb CC) e com valores de hemoglobina fetal acima do normal apresentam este cristal intracelular e extracelularmente. Quando no interior da hemácia, geralmente está excêntrico à célula. O cristal tem uma coloração densa e um formato típico de um cristal hexagonal longilíneo.

As hemácias que contêm um ou mais cristais de hemoglobina C estão totalmente desprovidas de hemoglobina, exibindo um aspecto "vazio", com apenas o cristal no interior da célula (Figura 3.47). O baço remove os cristais livres ou extracelulares. Os pacientes com o fenótipo do tipo hemoglobina C/beta-talassemia maior também podem apresentar no esfregaço do sangue periférico os cristais de hemoglobina C.

Corpos de inclusões de hemoglobina H

Os corpos de inclusões de Hb H (agregados de cadeia beta em excesso) são observados na alfatalassemia e na forma adquirida da doença da Hb H em pacientes com síndrome mielodisplásicas e mielodisplasia. Também são vistos em pacientes com hemoglobinas instáveis, esplenectomizados e após ingestão ou inalação de alguns produtos químicos (Figura 3.48).

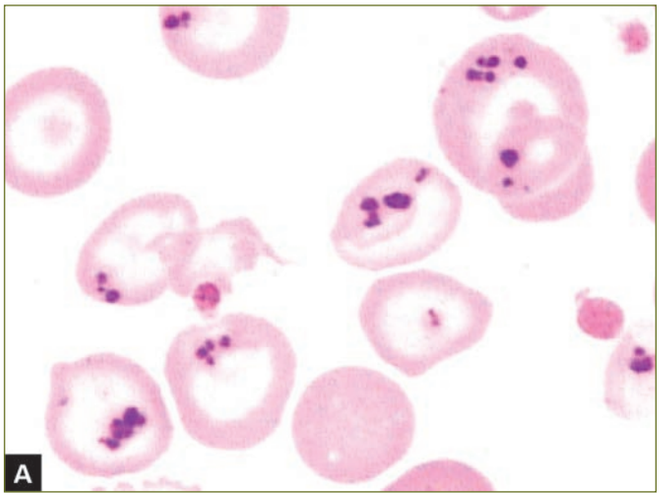
Malária

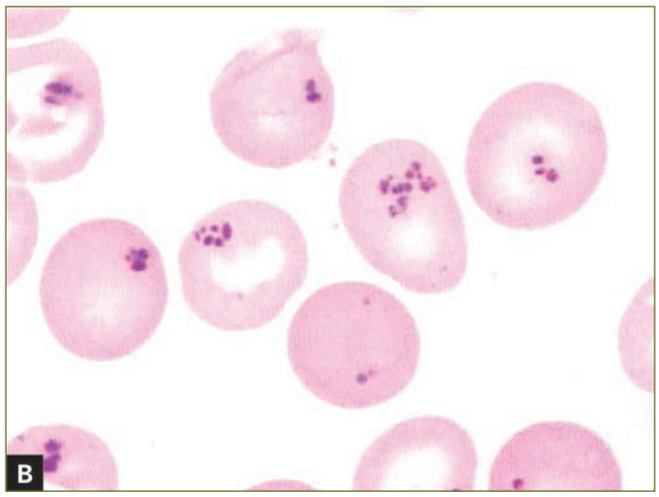
A malária, também conhecida pelos nomes febre palustre, impaludismo maleita e sezão, é causada pelos protozoários do gênero Plasmodium, como *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* e tem como vetor as fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os principais sintomas (sudorese, febre alta e calafrios) podem se manifestar a cada 48h. Caso a infecção tenha sido causada pelo *P. falciparum* ou pelo *P. vivax*, manifestam-se a cada 72h quando o agente causador é o *P. malarie* (febre quartã). No esfregaço do sangue periférico, podem ser observadas as formas evolutivas da malária: trofozoítos, esquizontes, merozoítos e gametócitos (Figura 3.49).

AGLUTINAÇÃO DAS HEMÁCIAS

Crioaglutinina

A existência de crioaglutinina ou anticorpos frios promove no esfregaço do sangue periférico um fenômeno de aglutinação das hemácias bastante característico (Figura 3.50). Na maioria dos casos, a aglutinação ocorre na coleta, no momento em que o sangue entra em contato com o tubo não aquecido, formando o empilhamento específico das hemácias. A crioaglutinina





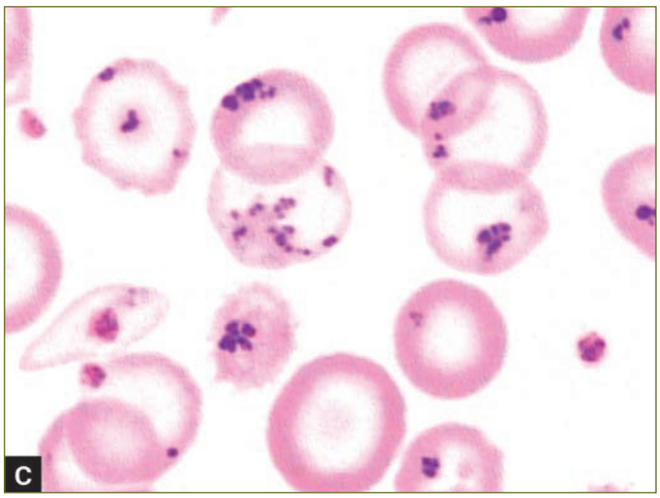
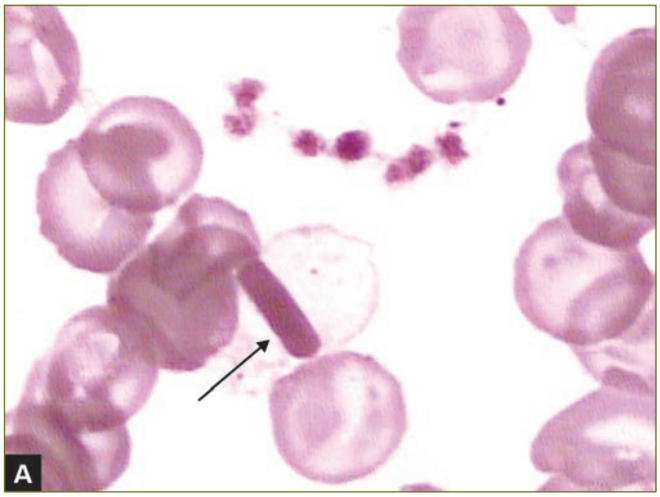
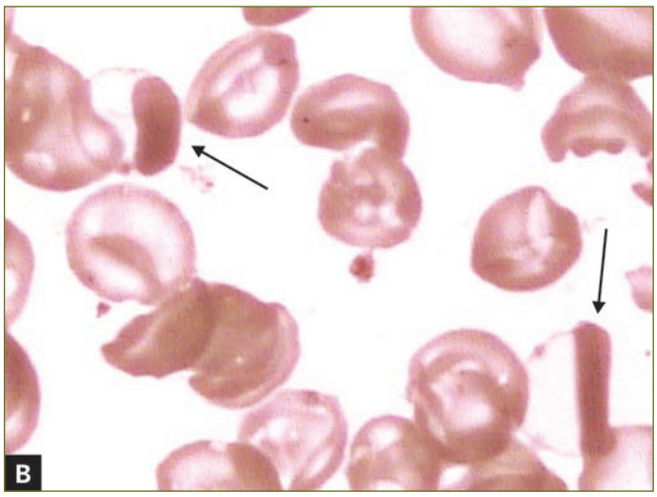


Figura 3.46 (**A** a **C**) Corpúsculos de Pappenheimer (2.000×)





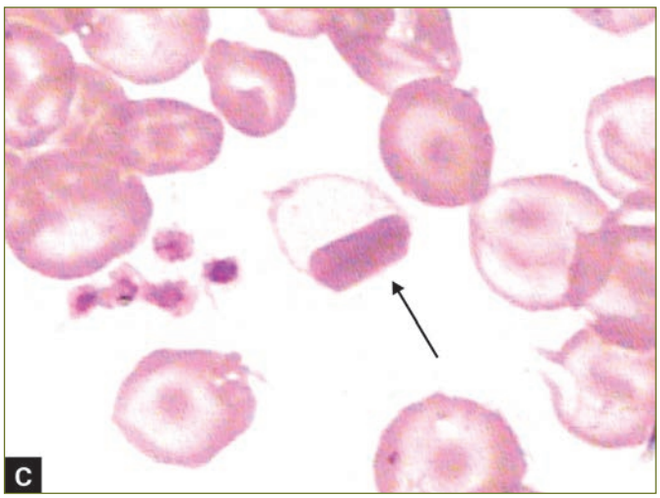


Figura 3.47 (**A** a **C**) Cristais de hemoglobina C (*setas*) (2.000×)

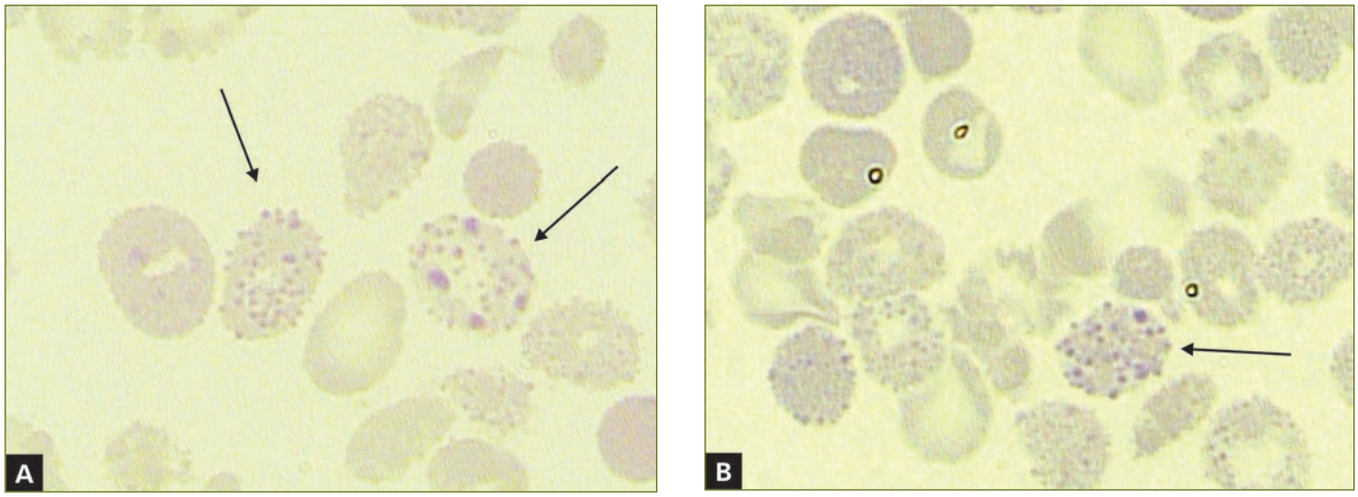


Figura 3.48 (**A** e **B**) Agregados de hemoglobina H com o padrão "bola de golfe" (*setas*) (2.000×)

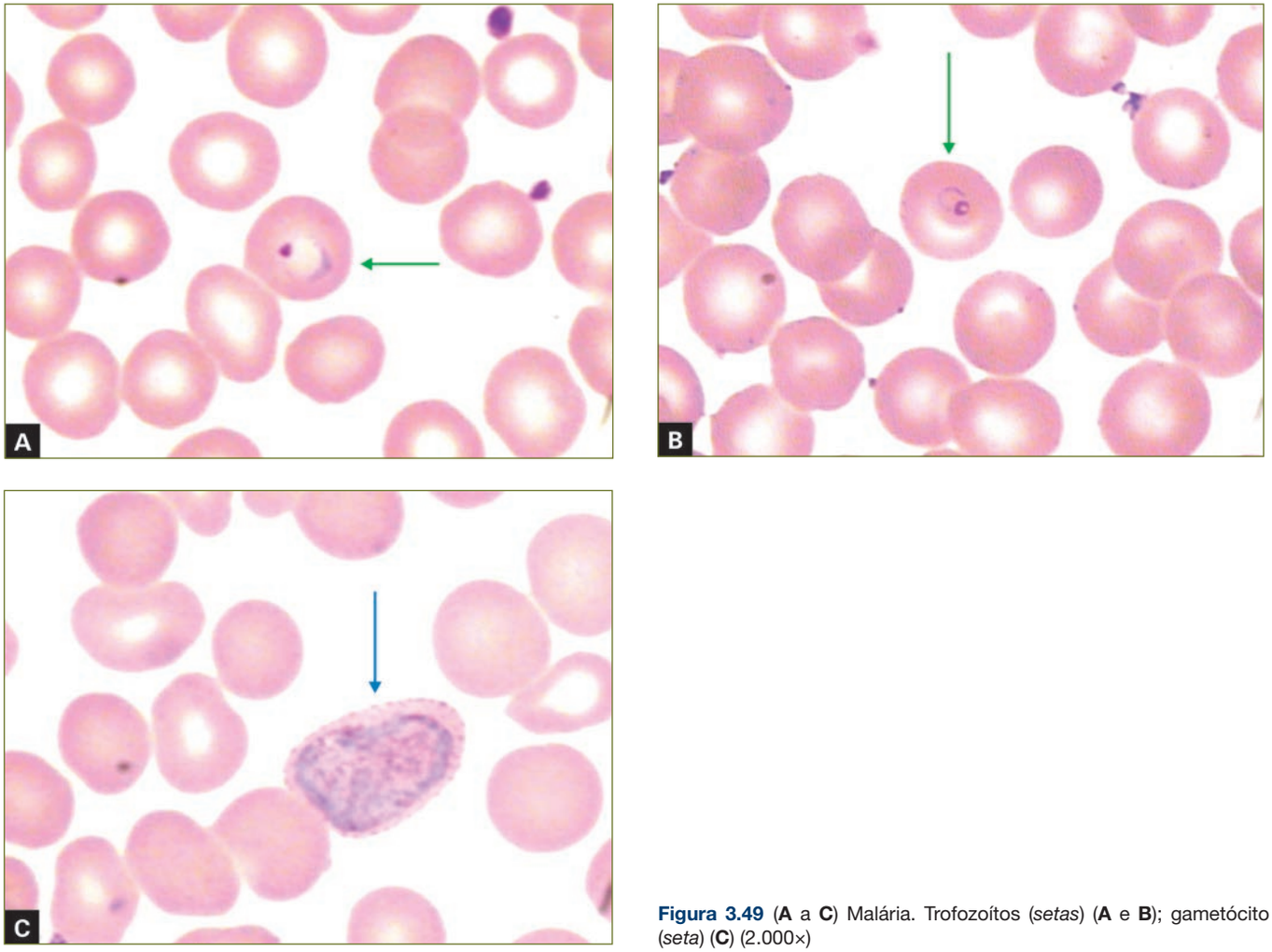


Figura 3.49 (**A** a **C**) Malária. Trofozoítos (*setas*) (**A** e **B**); gametócito (*seta*) (**C**) (2.000×)

é um anticorpo IgM livre, que tanto pode causar aglutinação quanto hemólise por meio do sistema complementar, levando à anemia hemolítica induzida por crioaglutinina.

No hemograma, os índices hematimétricos estão com resultados anormais e as hemácias empilhadas são contadas juntas pelos analisadores automatizados, promovendo valores de VCM, HCM e CHCM falsamente alterados. Para corrigir esse erro de análise, é importante aquecer o sangue em banho-maria a 36°C por, no mínimo 30min e somente após esse procedimento realizar uma nova análise da amostra.

Rouleaux eritrocitário

No interior da hemácia, a carga elétrica é positiva, devido à concentração de íons K^+ (potássio) ser maior que a de íons Na (sódio). Com isso, a carga elétrica ao redor da hemácia é negativa e, por isso, todas as hemácias se repelem uma às outras e não se empilham. Esse efeito entre as hemácias é conhecido como "fator zeta". Quando o "fator zeta" é anulado, forma-se o *rouleaux* eritrocitário. Isso ocorre em algumas situações, como no aumento das gamaglobulinas (mieloma múltiplo e na macroglobulinemia de Waldenström), em que ocorrem picos monoclonais de gamaglobulina. A formação de *rouleaux* eritrocitário tem correlação com a alteração do resultado de velocidade de sedimentação (VHS) das hemácias. Ao se formar o *rouleaux* eritrocitário, as hemácias ficam mais pesadas e sedimentam-se mais rapidamente, elevando o resultado do VHS (Figura 3.51).

Roseta de hemácias

Na roseta de hemácias, o neutrófilo é envolvido em toda sua superfície por hemácias, dando-lhe um aspecto de uma "flor". Nestes casos, as hemácias aderem-se aos neutrófilos mediados por anticorpos (Figura 3.52). A roseta de hemácias é frequente no esfregaço do sangue periférico em pacientes portadores de anemia hemolítica autoimune.

Hemácias cruzadas

Hemácias "cruzadas", sobrepostas em forma de "X" e com alterações de cargas elétricas, foram observadas em grande número por campo em raros pacientes com eliptocitose hereditária (Figura 3.53). Em pacientes apresentando este fenômeno, as hemácias foram lavadas com solução salina a 0,9%, por 5 vezes. Após a lavagem, foram confeccionados alguns esfregaços, e a pesquisa citológica de hemácias "cruzadas" foi negativa, comprovando a alteração de cargas elétricas entre as hemácias, anulada pela lavagem delas (técnica sugerida pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum).

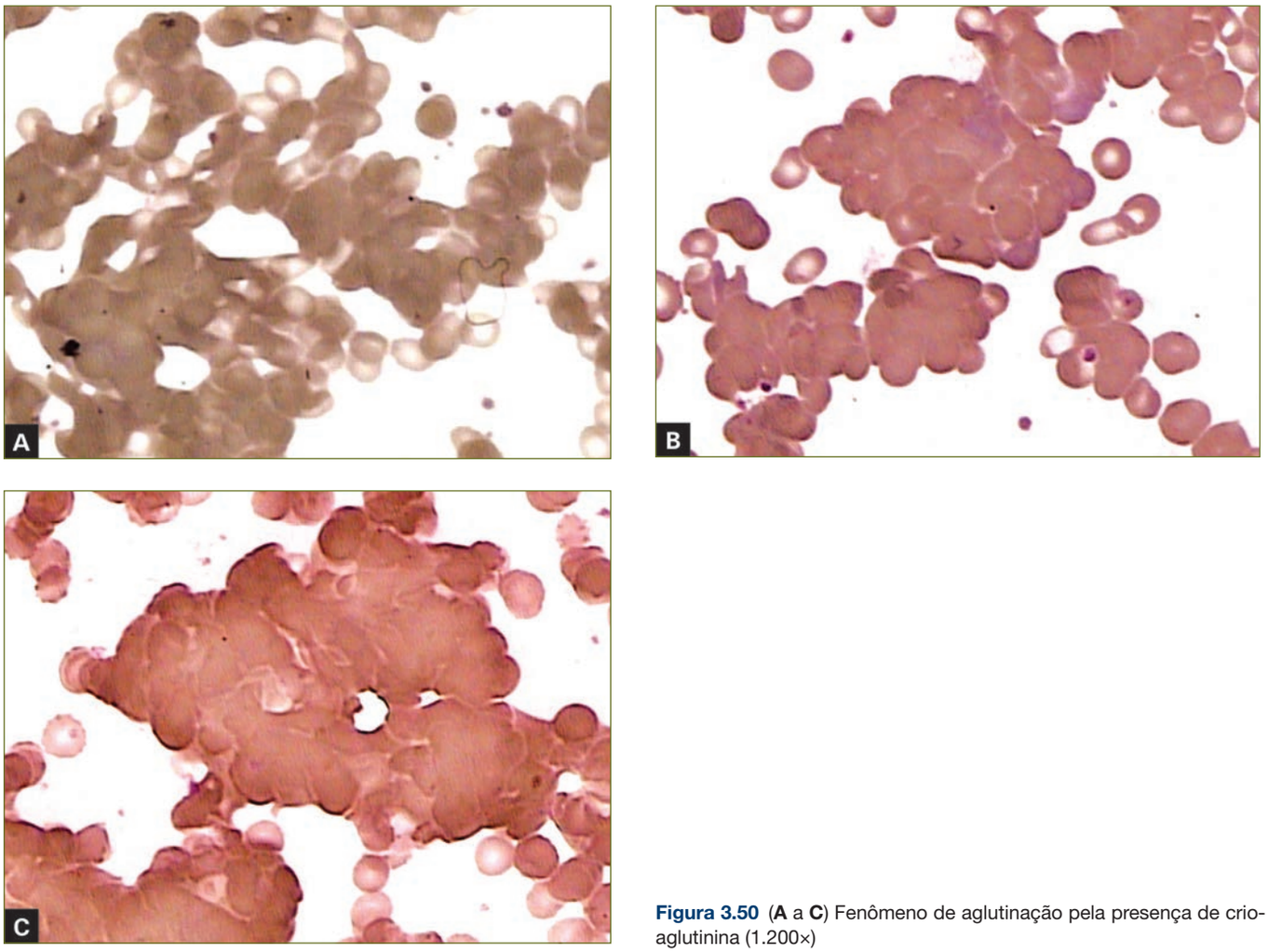
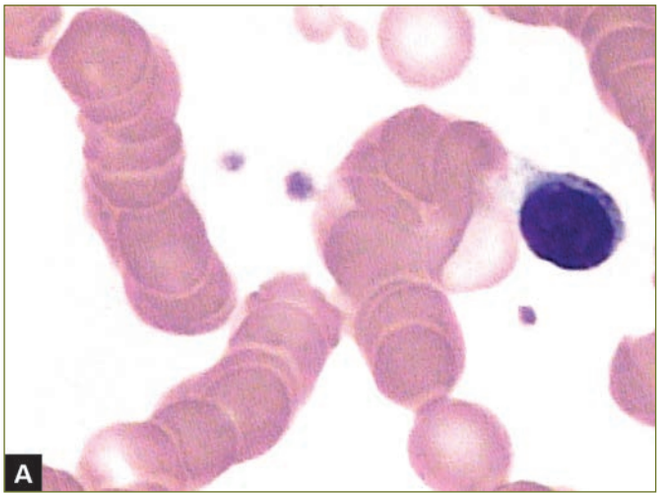
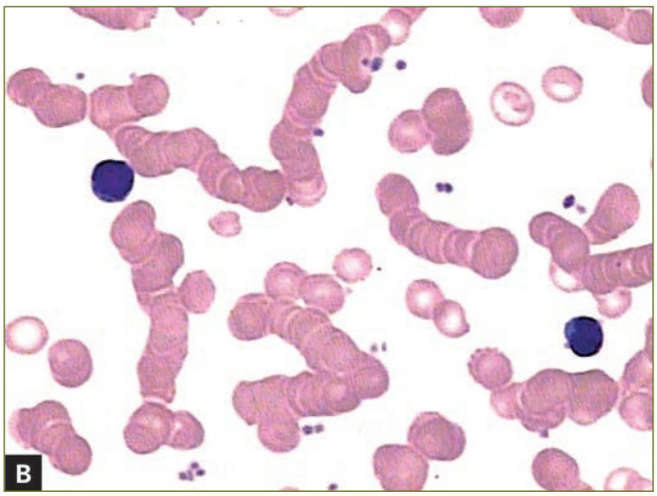


Figura 3.50 (**A** a **C**) Fenômeno de aglutinação pela presença de crioaglutinina (1.200×)





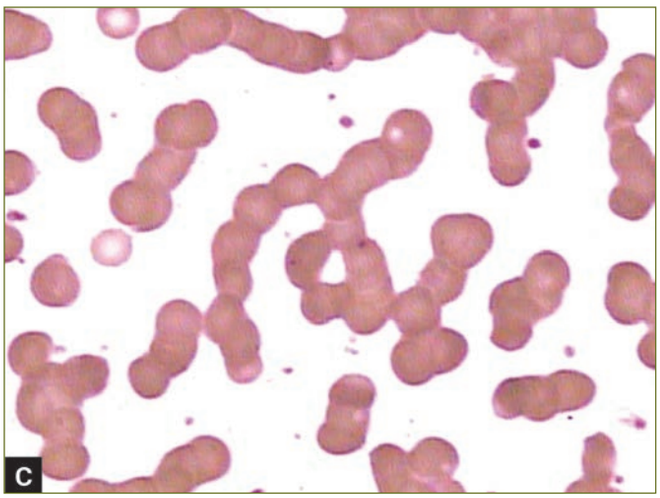
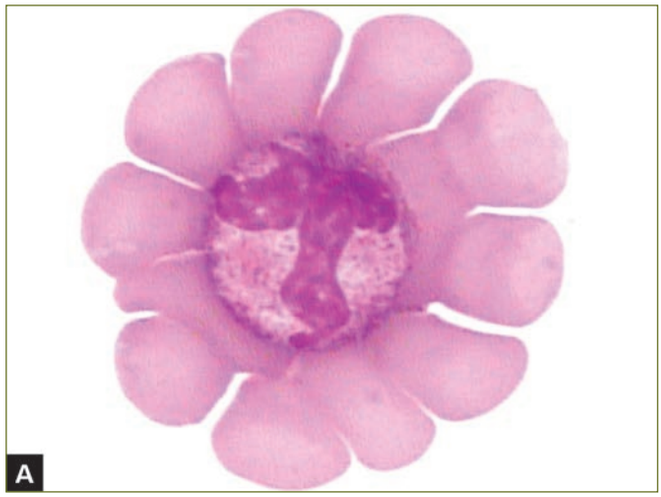


Figura 3.51 (**A** a **C**) *Rouleaux* eritrocitário (2.000×)



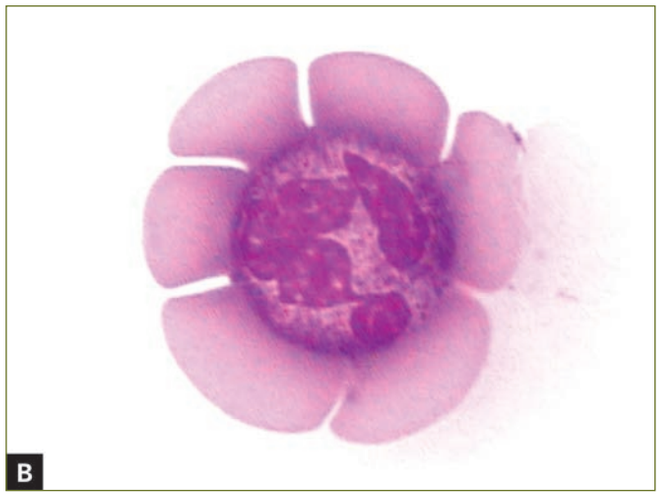


Figura 3.52 (**A** a **C**) Roseta de hemácias (2.000×)

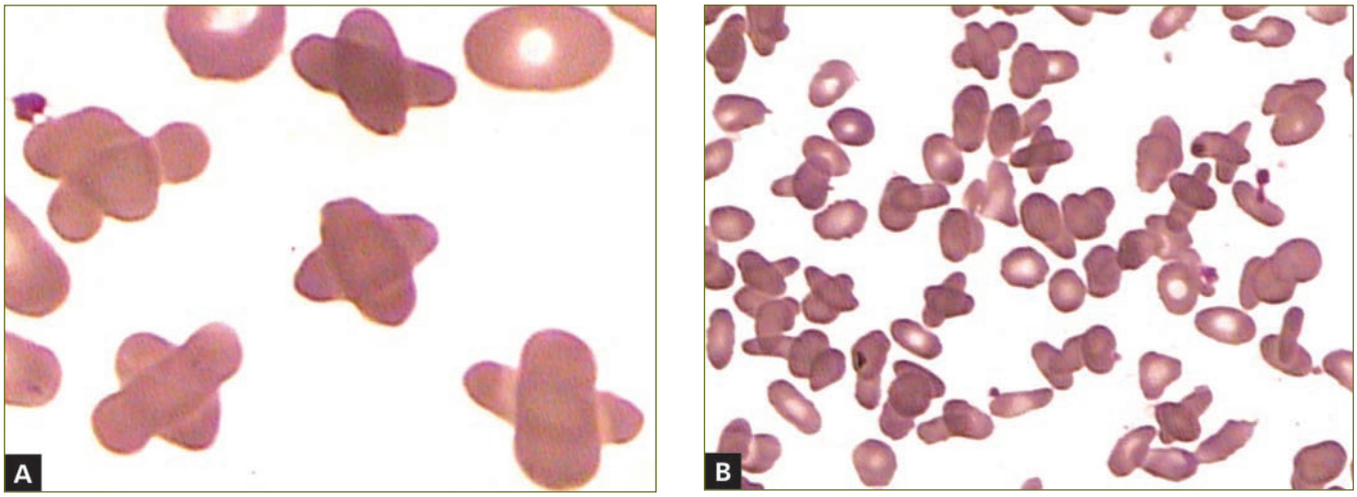


Figura 3.53 (**A** e **B**) Hemácias "cruzadas" (2.000×)

ANEMIAS CARENCIAIS

As anemias carenciais decorrem da deficiência de algum nutriente que seja essencial para uma eritropoese adequada. Ou seja, elas são causadas pela falta de um ou mais nutrientes essenciais para a produção das hemácias, como ferro, ácido fólico e vitamina B_{12}. A piridoxina e o ácido ascórbico também são considerados essenciais.

A absorção do ferro é facilitada pelo ácido hidroclorídico e pelo ácido ascórbico e depende de um componente proteico, a transferrina, para transportá-lo à medula óssea e aos órgãos de estocagem – deles, o fígado é o principal. A absorção da vitamina B_{12} requer um componente proteico, conhecido por fator intrínseco, que é uma substância presente no suco gástrico e secretado pelas células parietais da mucosa gástrica.

Geralmente, as anemias carenciais manifestam-se em crianças e adolescentes em fase de crescimento, na qual há mais necessidade dos nutrientes responsáveis pela formação e maturação das hemácias. Contudo, as anemias carenciais também são observadas em gestantes e mulheres com disfunções menstruais (hipermenorreia). Quando a ingestão insuficiente ocorre em idosos, geralmente os motivos principais são deficiência na mastigação, distúrbios gastrintestinais e condições socioeconômicas.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a anemia é definida segundo a concentração sanguínea de hemoglobina, ou seja, é uma situação patológica decorrente da diminuição da hemoglobina circulante em comparação com os valores esperados em pessoas saudáveis e da mesma faixa etária, sob as mesmas condições ambientais. Tendo-se como base apenas a concentração de hemoglobina em gramas por decilitros (g/dL), há uma concordância na literatura científica em se considerar um processo anêmico quando os valores de hemoglobina são inferiores a 13g/dL no homem, 12g/dL na mulher, 11g/dL em gestantes, crianças e adolescentes e 10g/dL em crianças abaixo de 6 anos.

Deve-se ressaltar a importância de uma análise completa do eritrograma para o diagnóstico da anemia – ou seja, a avaliação da contagem das hemácias, da dosagem de hemoglobina, do hematócrito e dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), assim como o RDW, a contagem de reticulócitos e a análise citomorfológica do esfregaço sanguíneo. Os principais sintomas da anemia são: fadiga, náuseas, dor de cabeça, tontura, dispneia, desânimo etc. Dependendo da gravidade da anemia, pode ocorrer prejuízo no crescimento e no desempenho muscular e comprometimento no desenvolvimento neurológico e no desempenho escolar, além de transtornos comportamentais como irritabilidade.

ANEMIA FERROPRIVA (DEFICIÊNCIA DE FERRO)

A anemia ferropriva é a anemia carencial mais comum em países desenvolvidos. No entanto, em países em desenvolvimento, representa um problema nutricional importante de saúde pública, afetando, principalmente, crianças e mulheres em idade reprodutiva. As principais causas da anemia ferropriva são fatores fisiológicos (gravidez, lactação, menstruação), fatores nutricionais (dieta pobre em alimentos que contêm ferro) e fatores patológicos (parasitoses, doenças gastrintestinais e outras doenças que alteram a absorção do ferro).

A anemia ferropriva ocorre quando as reservas de ferro do organismo tornam-se insuficientes para manter a eritropoese e, consequentemente, a concentração normal de hemoglobina no sangue. Em condições normais, a quantidade de ferro existente no corpo humano fica em torno de 40 a 50mg/kg de peso, sendo que a maior parte deste elemento (30mg/kg) está incorporado à hemoglobina. O restante do ferro encontra-se principalmente armazenado nas proteínas de estoque (ferritina e hemossiderina), presentes nas células do sistema mononuclear fagocitário do fígado, baço e medula óssea e no parênquima hepático.

Diariamente, são absorvidos cerca de 1 a 2mg de ferro pela dieta. Essa absorção ocorre em especial no duodeno e é praticamente a mesma quantidade que se perde no mesmo período por descamação ou menstruação.

O ferro dos alimentos existe sob duas formas: o ferro heme (Fe^{2+}), presente nas carnes vermelhas e de fácil absorção, e o ferro não heme (Fe^{3+}), contido em verduras, grãos e cereais, cuja absorção depende de sua conversão para (Fe^{2+}) pela ação do pH ácido do estômago.

Na anemia ferropriva, além do cansaço e fraqueza, a deficiência acentuada de ferro pode ocasionar inflamação da mucosa da boca e alteração do apetite por substâncias não nutritivas como a terra e o gelo. A deficiência de ferro prejudica a eritropoese, o que resulta na produção de hemácias com menor quantidade de hemoglobina no seu interior, portanto, com menor volume e mais hipocrômicas.

No hemograma da anemia ferropriva, as alterações típicas são anemia microcítica e hipocrômica, ou seja, VCM e CHCM estão diminuídos e o RDW, aumentado.

Na citomorfologia do esfregaço sanguíneo, observa-se anisocitose significativa, com pecilocitose caracterizada pela existência de eliptócitos, hemácias em lágrima, leptócitos, hemácias hipocrômicas e, por vezes, plaquetose de discreta a moderada intensidade. Geralmente, a contagem de reticulócitos encontra-se diminuída (Figura 3.54).

Quando há ferropenia, o organismo no início consegue manter o aporte de ferro aos tecidos a partir da mobilização do ferro depositado na forma de estoque. Desse modo, em geral a ferritina é o primeiro parâmetro a diminuir. Uma vez esgotado o estoque, inicia-se a mobilização do ferro ligado às proteínas de estoque, em especial a transferrina, diminuindo sua saturação pelo ferro. Finalmente, quando não há mais ferro no estoque, nem ligado a proteínas, o ferro sérico passa a ser utilizado. Dessa maneira, as dosagens de ferro sérico, ferritina, saturação da transferrina estarão diminuídas, enquanto a capacidade de fixação do ferro estará aumentada.

ANEMIA MEGALOBLÁSTICA (DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B_{12} E/OU ÁCIDO FÓLICO)

A anemia megaloblástica é causada pela deficiência de vitamina B_{12} e/ou ácido fólico, em geral devido ao déficit de alimentos de origem animal, especialmente leite, carnes e ovos (vitamina B_{12}) e frutas, feijão, fígado, nozes e vegetais verdes (ácido fólico).

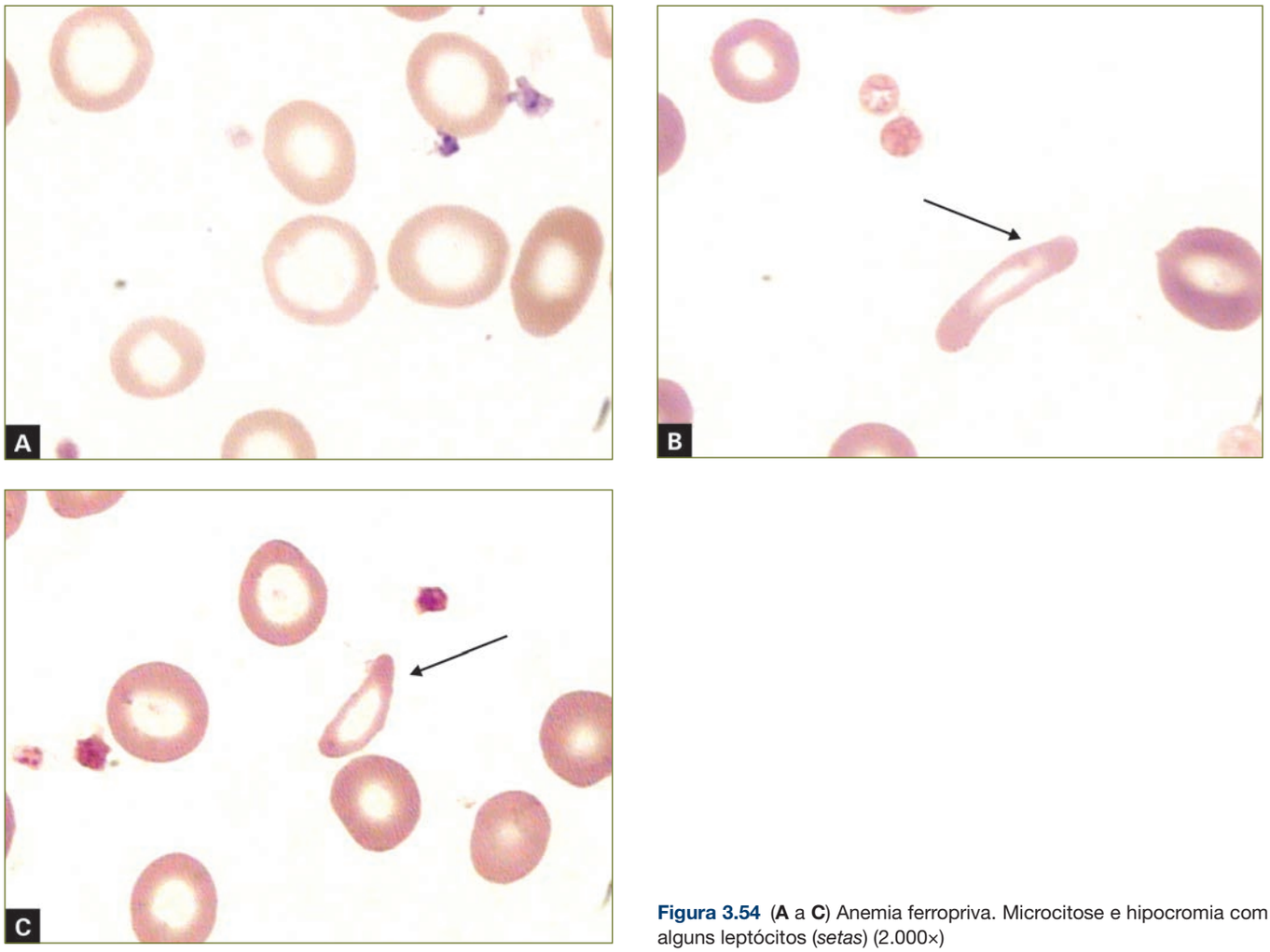


Figura 3.54 (**A** a **C**) Anemia ferropriva. Microcitose e hipocromia com alguns leptócitos (*setas*) (2.000×)

Tanto o ácido fólico quanto a vitamina B_{12} são indispensáveis para a síntese da timidina, um dos nucleotídios que compõem o DNA. Assim, a carência de um deles tem como consequência uma menor síntese deste nucleotídio. A síntese inadequada de DNA tem como consequência modificações do ciclo celular e retardo da sua duplicação.

A anemia perniciosa é outra causa de anemia megaloblástica, em que autoanticorpos são produzidos contra as células parietais do estômago, causando gastrite atrófica e reduzindo a produção de fator intrínseco (na mucosa gástrica), o qual é indispensável para a absorção da vitamina B_{12} no duodeno. O principal mecanismo fisiopatológico da anemia megaloblástica é a hemólise intramedular, que configura o quadro de eritropoese ineficaz, caracterizado pela medula hipercelular, com hiperplasia da série vermelha e presença de megaloblastos.

As principais causas da anemia megaloblástica são dieta insuficiente (vegetariana), baixa absorção, medicação (quimioterapia), hepatopatias, anemia hemolítica, alcoolismo etc. Entre os sintomas, destacam-se, astenia, diarreia, úlcera de boca e faringe, alterações na pele, enjoos e perda de cabelo.

No hemograma, destacam-se a macrocitose com VCM elevado, presença de macro-ovalócitos, corpúsculo de Howell-Jolly, anel de Cabot, hemácias em lágrima, pontilhado basófilo, hipersegmentação dos neutrófilos, RDW normal ou aumentado, leucopenia, plaquetopenia e contagem de reticulócitos diminuída (Figura 3.55).

A desidrogenase lática (DHL) está aumentada, devido à hemólise dos precursores hematopoéticos. A confirmação diagnóstica ocorre por meio dos valores diminuídos de vitamina B_{12} e ácido fólico, como também com base nas alterações características do sangue periférico e da medula óssea.

HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias decorrem de alterações genéticas responsáveis pelo sequenciamento e pela estrutura dos peptídios que compõem a globina, além de alterações moleculares e enzimáticas que participam formando o grupo heme. A presença de um gene que determina a substituição de uma das bases nitrogenadas por outra diferente (mutação) resulta em alterações moleculares e químicas na estrutura da hemoglobina, promovendo, entre outras modificações na hemoglobina, a diferença de afinidades pelo oxigênio. Por exemplo, a hemoglobina S é formada por uma mutação: o aminoácido valina (VAL) é introduzido no local do ácido glutâmico (GLU) na posição 6 da cadeia da globina beta. Isso ocorre devido à troca da base nitrogenada adenina pela timina, levando a uma menor afinidade por oxigênio pela hemoglobina. As hemoglobinopatias

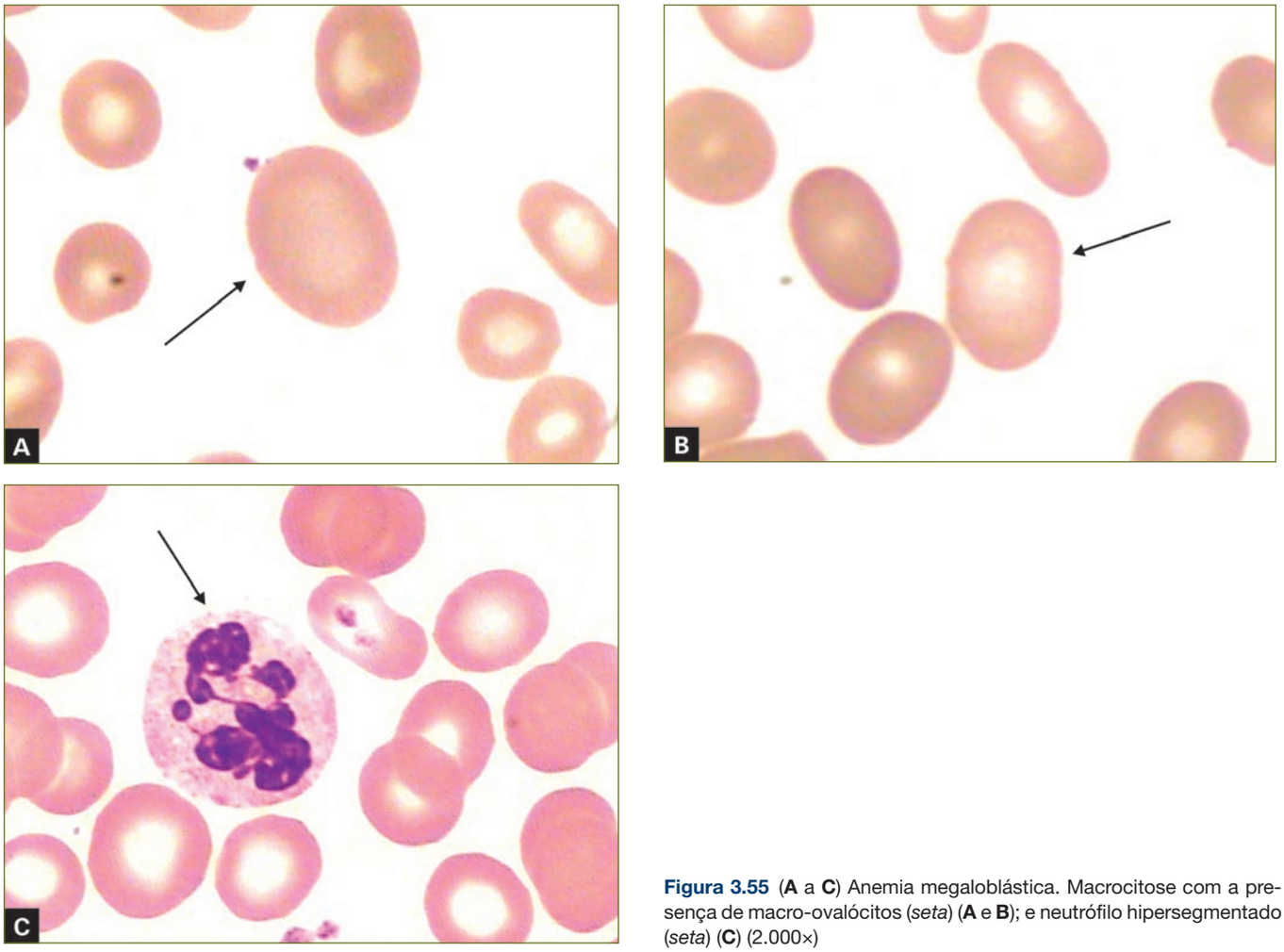


Figura 3.55 (**A** a **C**) Anemia megaloblástica. Macrocitose com a presença de macro-ovalócitos (*seta*) (**A** e **B**); e neutrófilo hipersegmentado (*seta*) (**C**) (2.000×)

também podem ocorrer por defeitos na síntese quantitativa de hemoglobinas (talassemias).

HEMOGLOBINAS VARIANTES COM ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS (HB S, HB SC, HB C)

Hemoglobina S – doenças falciformes

A Hb S é formada por uma mutação no gene beta, no qual a VAL um aminoácido neutro é trocado pelo aminoácido carregado negativamente GLU. Isso acarreta uma Hb carregada menos negativamente, o que resulta em uma mobilidade mais lenta na eletroforese alcalina (pH 8 a 9), se comparada com a Hb normal, Hb A. A entrada da valina nessa posição do GLU também favorece a polimerização da hemoglobina em condições de baixo teor de oxigênio.

Após a polimerização da Hb S com a falcização da hemácia, a bomba de sódio e potássio da célula sofre alteração na sua função. Assim, diminuem-se os níveis de potássio e de água intracelular e elevam-se a concentração de sódio, o que torna a hemácia mais densa com menos capacidade de permeabilidade celular. Tais alterações morfológicas repetitivas provocam lesões crônicas na membrana da hemácia, tornando-a irreversivelmente falcizada.

Os pacientes homozigotos (Hb SS) apresentam um percentual de hemácias irreversivelmente falcizadas entre 4% e 44% do total das hemácias, geralmente em número constante na mesma pessoa e com pouca variação individual. Dessa maneira, as hemácias irreversivelmente falcizadas são formadas logo após sua saída da medula óssea nesses pacientes e retiradas brevemente por fagocitose e hemólise intravascular (Figura 3.56).

A expressão *sickle cell disease*, doença das células falciformes, foi criada por Mason em 1922 para descrever uma anormalidade na hemoglobina que se apresentava em pacientes negroides, com células falcizadas no esfregaço do sangue periférico, icterícia, úlceras de membros inferiores, fraqueza, evidente anemia e reticulocitose. Em 1927, Hahn & Gillespie atribuíram o defeito à hemoglobina e não à hemácia, o que demonstra a dependência do fenômeno de falcização com a tensão de oxigênio. Pauling e colaboradores, em 1949, demonstraram a diferença de carga elétrica da globina S por meio da mobilidade eletroforética. Em 1978, com a introdução da biologia molecular, descobriu-se que a hemoglobina S tem várias origens (ao menos 5 tipos: SS-Benin, SS-Bantu, SS-Senegal, SS-Camarões e SS-Árabe-indiano). Entretanto, todos esses tipos apresentam a mesma mutação. Tal variação de aplótipos esclarece a diversidade clínica na anemia falciforme, que se

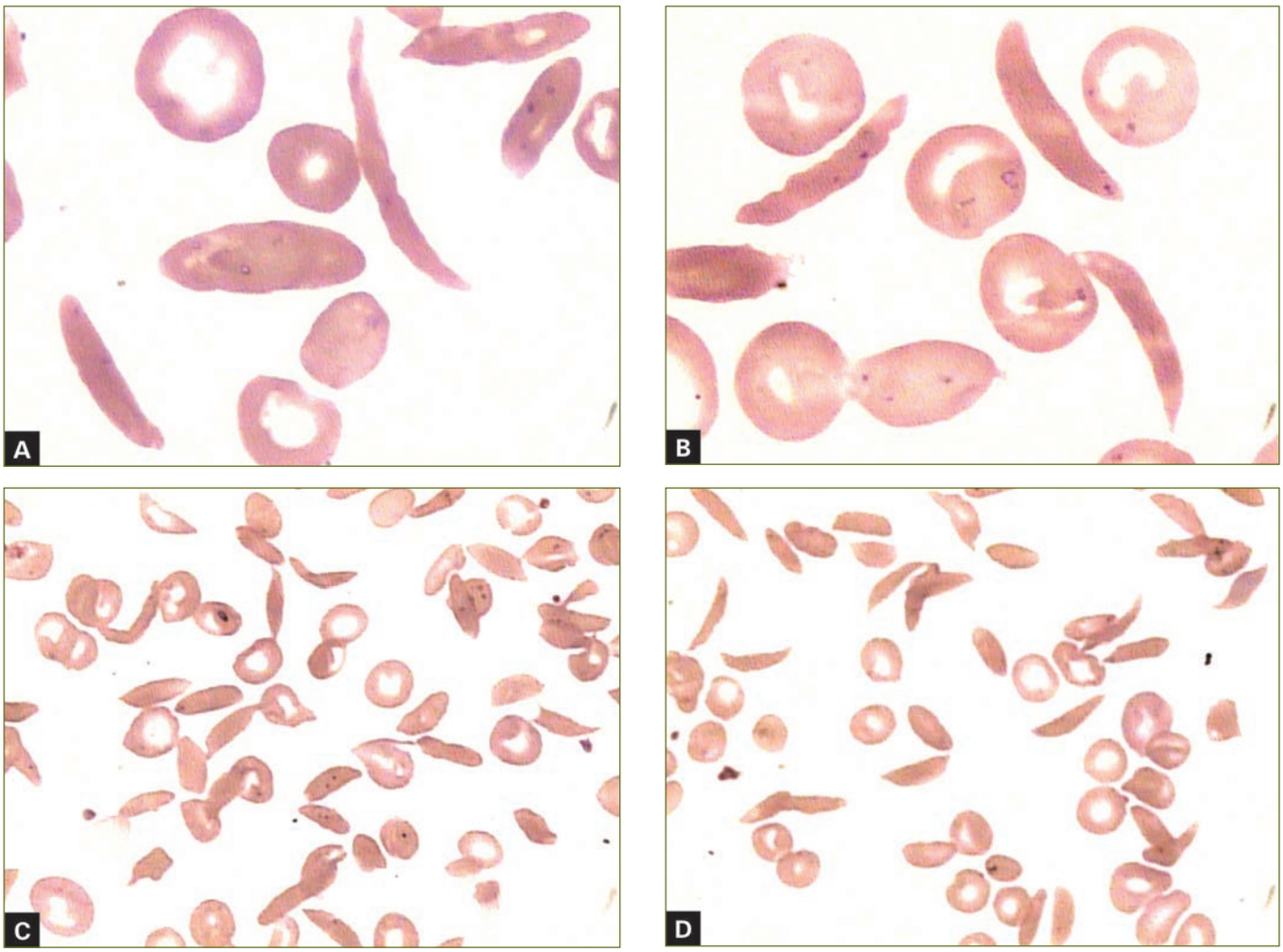


Figura 3.56 (**A** a **D**) Hb SS: numerosas hemácias falcizadas (2.000×)

apresenta, em alguns casos, com uma evolução bastante grave e, em outros, com evolução benigna.

Para identificar todas as associações da Hb S, criou-se a expressão doenças falciformes. Tais associações assemelham-se clinicamente à anemia falciforme, que tem o gene Hb SS. Os exemplos mais comuns de doenças falciformes são os heterozigotos SC, a S-betatalassemia e a SD. Entretanto, a associação da Hb S à Hb A (Hb AS), clinicamente, é assintomática. Os mecanismos patológicos que ocorrem na doença falciforme são: hemólise, vaso-oclusão e falência de órgãos. A hemólise na doença falciforme pode provocar anemia, esplenomegalia, icterícia, hepatomegalia e alterações ósseas. Enquanto isso, a vaso-oclusão, dependendo do local, pode levar a destruição do baço, acidente vascular encefálico, úlcera de perna, necrose asséptica da cabeça do fêmur e priapismo, entre outros.

Obtém-se o diagnóstico pela comprovação da presença da hemoglobina S na eletroforese em pH 8,6 (alcalino). Testes como falcização das hemácias, utilizando o metabissulfito de sódio e o teste de solubilidade das hemoglobinas, também são empregados como testes complementares. O estudo do esfregaço do sangue periférico demonstra a existência de hemácias falcizadas, hemácias em alvo e evidente policromasia. Além disso, ocasionalmente podem ser observados corpúsculos de Howell-Jolly e eritroblastos circulantes. Geralmente, os níveis de reticulócitos estão entre 5% e 20%, a dosagem de hemoglobina varia entre 6 e 9g/dL e a bilirrubina indireta e o DHL estão elevados.

Hemoglobina SC

A Hb C na hemácia estimula a polimerização da Hb S promovendo alterações clínicas semelhantes às presentes na anemia falciforme (Hb SS). A Hb SC é uma variante falcêmica de caráter hereditário. Clinicamente, os pacientes portadores da Hb SC podem se apresentar de modo mais brando, com menor frequência de casos de crises vaso-oclusivas, dor óssea e dor abdominal. O paciente é um heterozigoto para os genes Hb S (cadeia beta S) e genes Hb C (cadeia beta C), razão pela qual apresenta a hemoglobina do tipo SC.

O achado laboratorial mais característico desta hemoglobinopatia são as numerosas hemácias em alvo no esfregaço do sangue periférico e pecilócitos específicos, formados pelos cristais de hemoglobina SC. Esses pecilócitos são densos e apresentam vários graus de curvatura, lembrando as hemácias falciformes. Entretanto, exibem bordas retas e ramificadas, diferenciando-se das hemácias falciformes (Figuras 3.57 a 3.60).

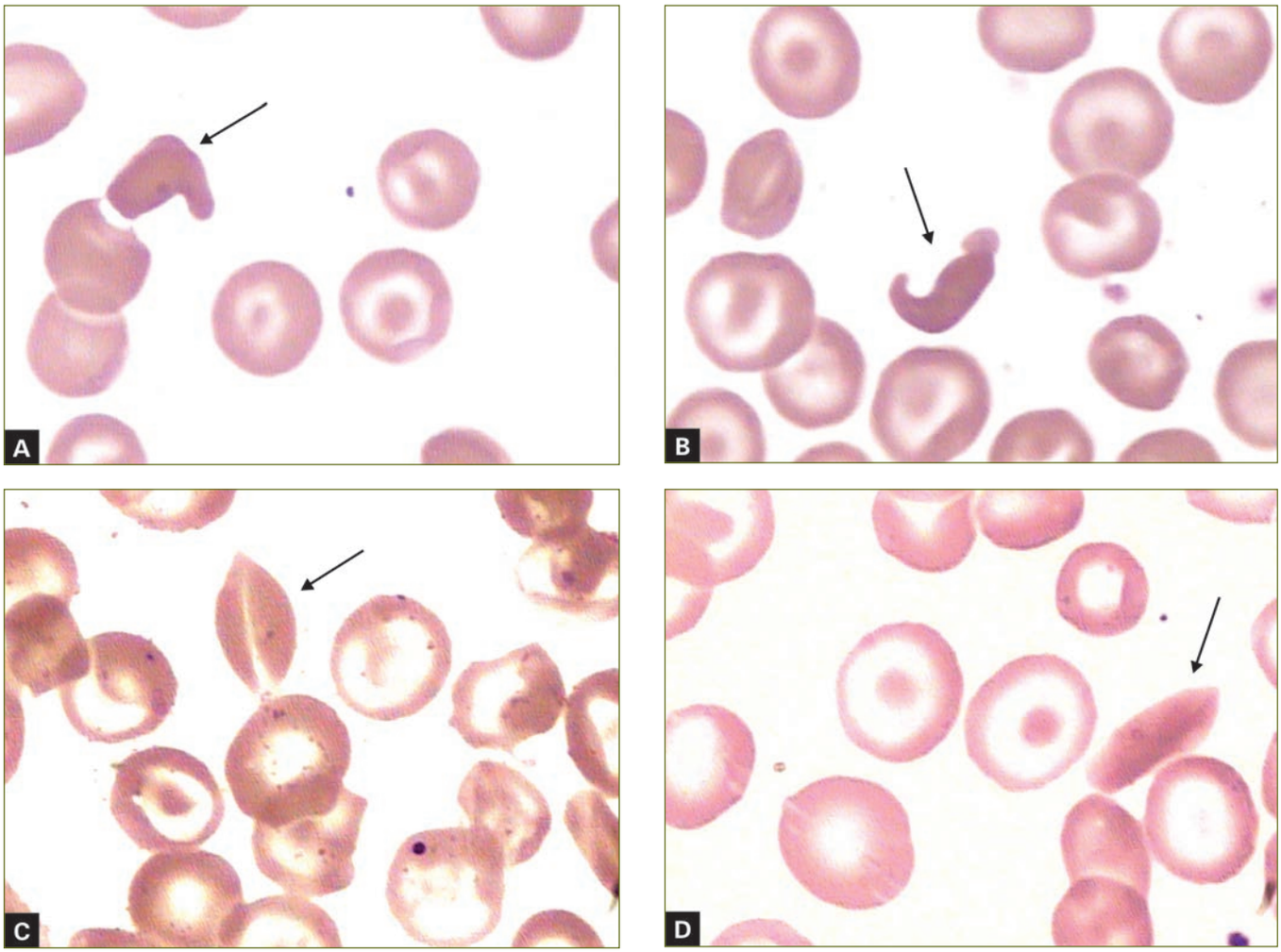


Figura 3.57 (**A** a **D**) Hb SC. Pecilócitos específicos, formados por cristais de Hb SC (*setas*) (**A** e **B**); hemácia em concha (*seta*) (**C**); hemácia falcizada (**D**) (2.000×)

Figura 3.58 Teste de falcização das hemácias utilizando o metabissulfito de sódio: resultado positivo (1.200×)

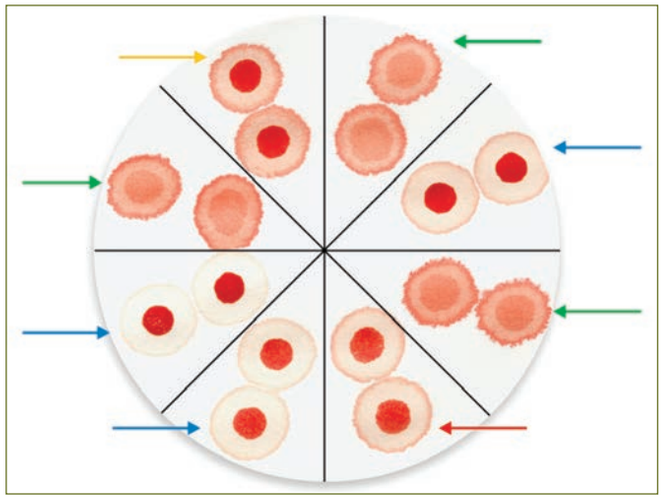


Figura 3.59 Teste de solubilidade das hemoglobinas em papel-filtro. Quando o resultado é positivo, ocorre a formação de um precipitado de Hb S, não absorvido pelo papel-filtro, como Hb SS (*seta azul*), Hb SC (*seta vermelha*), Hb AA (*seta verde*) e Hb AS (*seta amarela*)

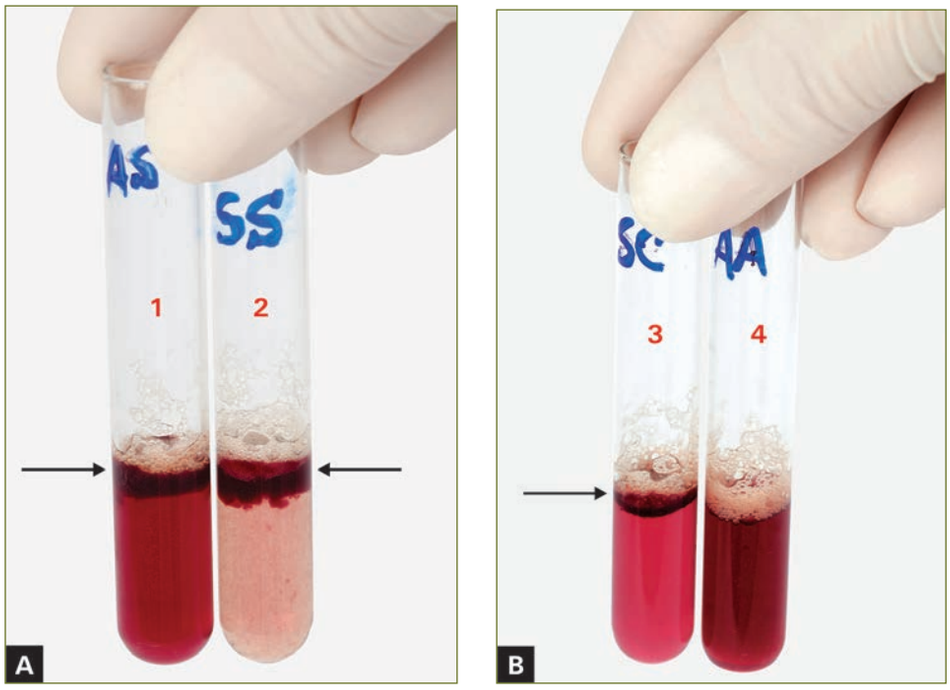


Figura 3.60 (**A** e **B**) Teste de solubilidade em tubo: formação de anel de precipitado de Hb S (*setas*). Hb AS (**1**), Hb SS (**2**), Hb SC (**3**) e Hb AA (**4**)

Doença da Hb C

A literatura médica demonstra que a hemoglobina C foi descoberta em 1950 por Itano & Neel, mas logo após foi relatado outro caso por Spreat. Em 1953, Ranney descreveu a existência de numerosas hemácias em alvo como um aspecto citomorfológico importante para o diagnóstico da doença. Os cristais formados pela Hb C foram descritos apenas em 1954, por Diggs. Em 1958, Hunt & Ingram identificaram a inserção do aminoácido lisina (LIS) substituindo o GLU, aminoácido de número 6 da globina beta, e a consequente formação da Hb C. Essa troca de aminoácidos faz com que a Hb C fique menos negativa, tornando sua mobilidade na eletroforese das hemoglobinas mais lenta que as Hb A e S.

A Hb C tem origem nos povos africanos, como a Hb S. No Brasil, a prevalência da Hb AC é maior que a da Hb AS, mas os pacientes homozigotos (Hb CC) são raros. No esfregaço do sangue periférico dos pacientes homozigotos (Hb CC), observam-se anemia hemolítica de intensidade variável (com dosagem de hemoglobina entre 9 e 12g/dL), moderada reticulocitose (entre 3% e 8%), numerosas hemácias em alvo e ocasionais

cristais de Hb C – não removidos pelo baço devido a insuficiência esplênica (Figura 3.61). Os autores relatam que os cristais de Hb C no esfregaço sanguíneo possibilitam o diagnóstico da doença da Hb C (Araújo et al, 1999). No entanto utiliza-se para o diagnóstico a eletroforese das hemoglobinas em pH 6,2 (ácido), já que na eletroforese em pH 8,6 (alcalino) não é possível separar a Hb C da Hb A_2, o que impossibilita o resultado correto. Os indivíduos heterozigotos (Hb AC) são assintomáticos, sem anemia nem evidências de hemólise.

HEMOGLOBINAS VARIANTES SEM ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS

Hemoglobina D

A hemoglobina D (Hb D) é uma variante β (beta) que apresenta a mesma mobilidade eletroforética da Hb S em pH alcalino. Por meio da eletroforese ácida (pH 5 a 6), é possível separar tais hemoglobinas. Geralmente, a fração anormal da Hb D varia de 30% a 50% da hemoglobina total. Quando associada à Hb A (Hb AD), a Hb D q é totalmente assintomática. Os casos de HB DD, homozigotos, são muito raros e apresentam uma discreta anemia com dosagem de hemoglobina entre 10,5 e 12,0g/dL, sem alterações morfológicas nas hemácias. No Brasil, a prevalência de pacientes com a Hb AD é de 1 caso para cada 5.000 pessoas analisadas. Após essa ter sido descrita, outras hemoglobinas com mobilidade eletroforética similares à da Hb D surgiram e foram diferenciadas estruturalmente de acordo com a mutação. Dessa maneira, a hemoglobina mais frequente entre as hemoglobinas variantes que têm a mesma mobilidade eletroforética da Hb S é a Hb D Los Angeles – ou Punjab.

Hemoglobina E

A Hb E é decorrente da substituição da lisina pelo GLU no códon 26 da globina beta. Tal mutação faz com que a Hb E posicione-se na eletroforese das hemoglobinas em pH alcalino, ligeiramente mais rápido que a Hb C, dificultando sua identificação. A Hb E na forma heterozigota (Hb AE) é assintomática, mas, no esfregaço do sangue periférico, apresenta discreta hipocromia, discreta microcitose e quantidade variável de hemácias em alvo (Figura 3.62). Na forma homozigota (Hb EE), ocorre anemia hipocrômica e microcítica (com várias hemácias em alvo) e, no estudo clínico, esplenomegalia. É a hemoglobina variante mais comum no sudeste da Ásia e bastante rara no Brasil.

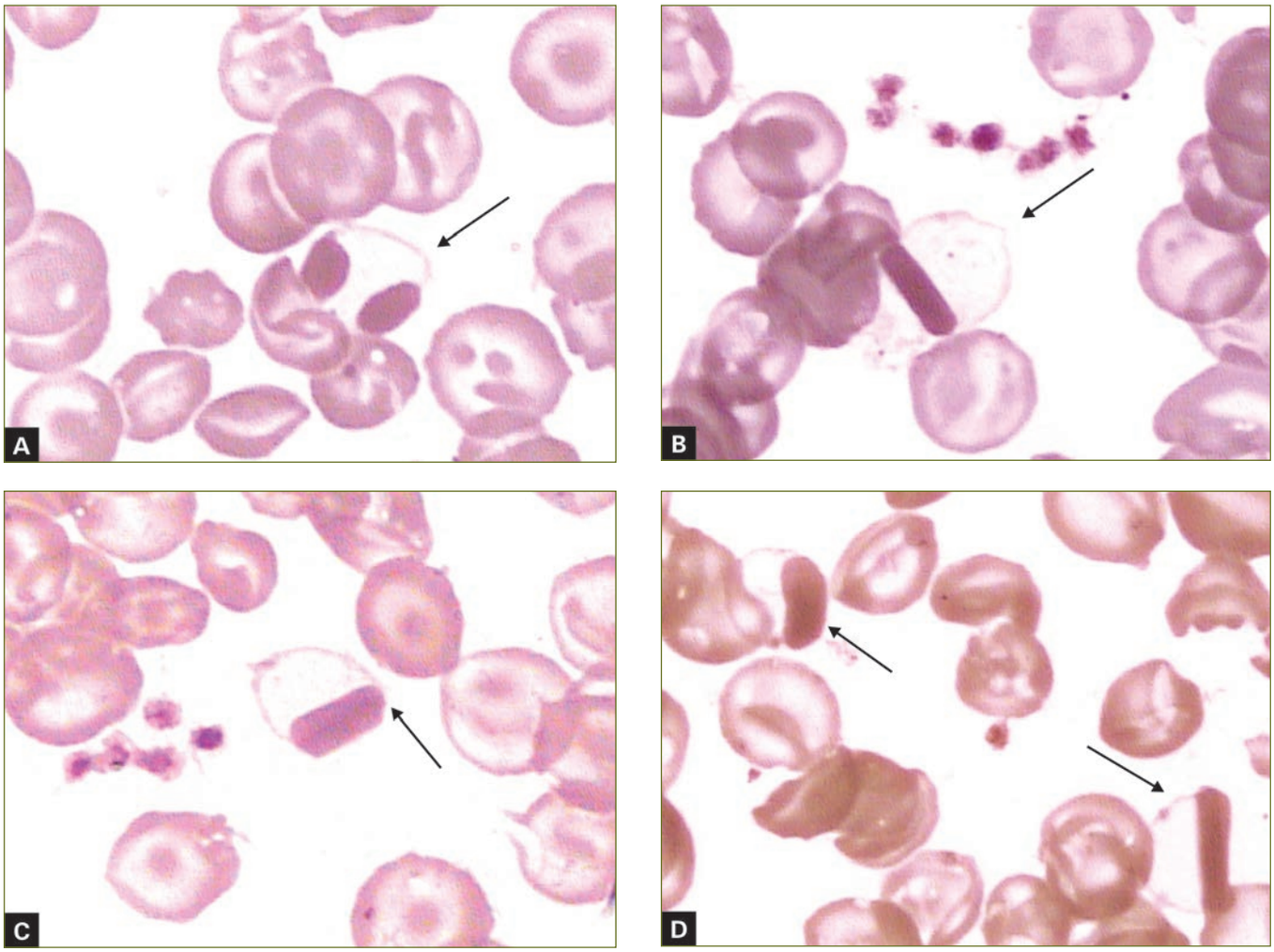


Figura 3.61 (**A** a **D**) Hb CC. Presença de numerosas hemácias em alvo e cristais de Hb C (*setas*) (2.000×)

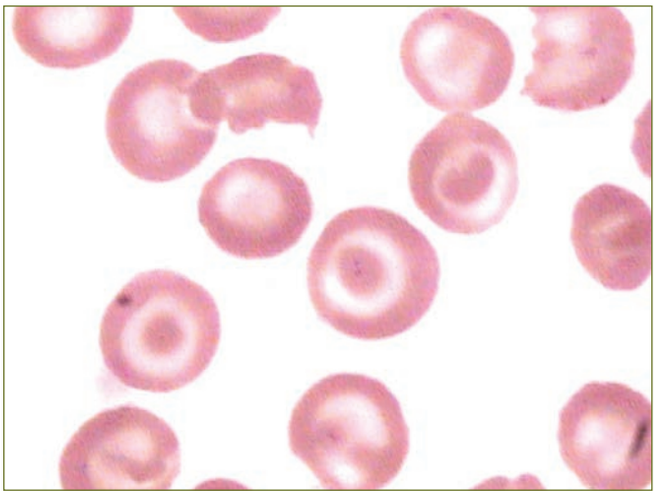


Figura 3.62 Hb E. Várias hemácias em alvo (2.000×)

Hemoglobina J

Esta hemoglobina variante apresenta uma mobilidade eletroforética mais rápida que a Hb A em pH alcalino, mas, na eletroforese das hemoglobinas em pH ácido, não é possível separar a Hb J da Hb A. Os pacientes portadores heterozigotos da Hb J (Hb AJ) são assintomáticos e apresentam os índices hematimétricos normais, sem hipocromia nem microcitose. Como em outras hemoglobinas variantes, a Hb J é muito rara na população do Brasil.

Hemoglobina G

Diversas hemoglobinas variantes pertencem a este grupo e migram na eletroforese das hemoglobinas em uma posição pouco atrás da Hb S – diferencia-se por meio da eletroforese em meio ácido. A Hb G Filadélfia é a mais frequente entre os tipos de Hb G no Brasil e nos EUA, devido à colonização dos negros nestes países e a Hb G tem origem africana. A Hb G Filadélfia é uma mutante da globina alfa, e sua concentração geralmente fica abaixo de 25%. Os pacientes portadores da Hb AG e Hb GG são assintomáticos, sem alterações no sangue periférico.

HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS

Atualmente, já foram identificadas quase 1.200 hemoglobinas variantes diferentes, das quais em torno de 200 são instáveis. As hemoglobinas instáveis são um grupo de variantes genéticas em que ocorrem mutações nas globinas alfa e beta, modificando a molécula e transformando-a em instável.

As hemoglobinas instáveis que causam anemia hemolítica têm como característica a formação de corpos de inclusão de Heinz. Esses corpos de inclusão das hemácias apenas são observados na coloração com azul de cresil brilhante, e sua produção relaciona-se com a gravidade da anemia e a instabilidade da hemoglobina.

No sangue periférico dos pacientes portadores de Hb instáveis, em crise de hemólise, geralmente provocadas por infecções, substâncias químicas oxidantes, antibióticos e quimioterápicos, há policromasia, hemácias em bolha, queratócitos (hemácias mordidas), picnócitos e hemácias irregularmente contraídas (Figuras 3.63 e 3.64).

No Brasil, a descoberta de novas hemoglobinas instáveis não é rara. Pesquisas em alguns estados, como São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Pernambuco, identificaram novas hemoglobinas instáveis. Como exemplos de Hb instáveis, podem-se citar a Hb Köln, a Hb Zurique e a Hb Hammersmith. Recentemente, Bezerra e colaboradores descreveram duas novas hemoglobinas instáveis de origem brasileira que levam à anemia hemolítica crônica: a Hb Caruaru, um provável caso de mutação nas células germinativas, e a Hb Olinda – consequente da remoção de 12 pares de base, sendo esta uma mutação *de novo*. Os pacientes portadores dessas duas hemoglobinas instáveis podem apresentar icterícia, hepatomegalia e esplenomegalia e, ocasionalmente, necessitam de transfusões de concentrado de hemácias.

HEMOGLOBINA VARIANTE COM FENÓTIPO TALASSÊMICO

A hemoglobina Lepore (Hb Lepore) pertence ao grupo de hemoglobinas variantes com migração eletroforética idêntica à Hb S. Existem três subtipos de Hb Lepore: Lepore Boston, Lepore Baltimore e Lepore Holanda, diferenciadas por estudos da composição peptídica da fusão delta-beta. A concentração dessa hemoglobina variante com fenótipo talassêmico é de 5% a 15% em eletroforese de hemoglobina alcalina e, geralmente, a Hb A_2 apresenta-se normal ou diminuída. Entretanto, quando a Hb fetal também está elevada, o quadro laboratorial e clínico é similar ao da talassemia beta menor, com microcitose, hipocromia e pecilócitos no sangue periférico. Na homozigose da Hb Lepore, ocorre um quadro laboratorial e clínico semelhante à talassemia beta maior ou intermediária.

TALASSEMIAS

As talassemias são doenças genéticas responsáveis pela redução ou ausência da síntese de um dos tipos de cadeias de globina. Produzem um acúmulo da cadeia não afetada, precipitando e aderindo na membrana, além de provocar lesões e destruir as hemácias prematuramente. As talassemias resultam de defeitos moleculares em genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas e se manifestam sob várias formas clínicas, dependendo da cadeia globínica comprometida e da intensidade da redução das cadeias globínicas. As formas de talassemias mais frequentes são a alfa e a beta. As manifestações clínicas são de grande importância nos portadores.

Talassemia alfa

A talassemia alfa é causada pela deficiência da síntese de uma ou mais cadeias alfa da hemoglobina, podendo ser decorrente de deleções ou mutações pontuais nos genes α^1 e/ou α^2. A talassemia α^1 ou α^0 é caracterizada pela perda de dois genes a no mesmo cromossomo (--/αa) e a talassemia α^2 ou a^+ é representada pela perda de um dos genes a em, pelo menos, um dos cromossomos (-a/αa). A talassemia α^2 é a mais frequente.

Clinicamente, existem três formas de talassemia alfa: traço talassêmico α (deleção de um ou dois genes α), doença da Hb

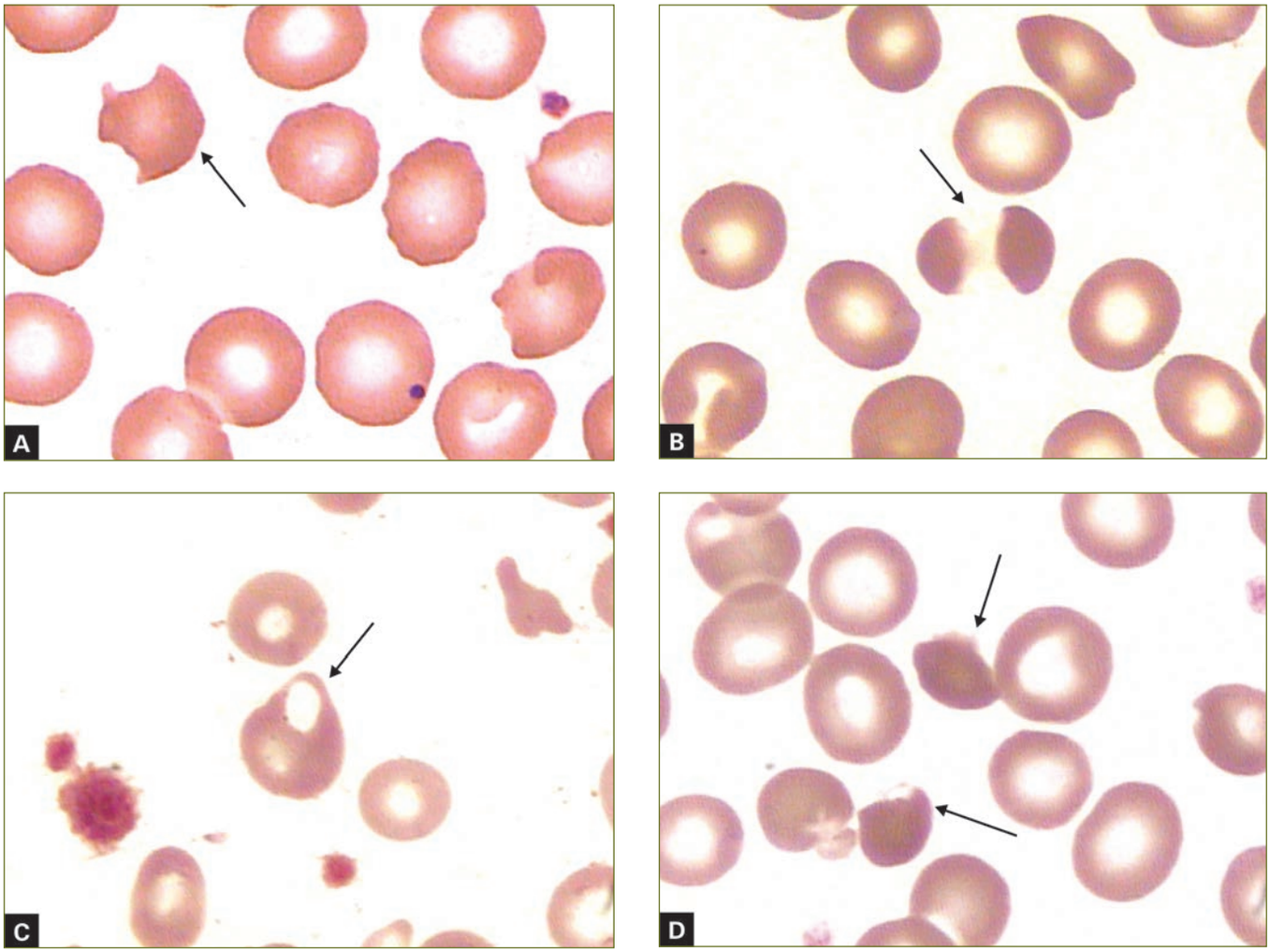


Figura 3.63 (**A** a **D**) Hemoglobinas instáveis. Queratócito (*seta*) (**A**); picnócito (*seta*) (**B**); hemácias irregularmente contraídas (*setas*) (**C**); e hemácia em bolhas (*seta*) (**D**) (2.000×)

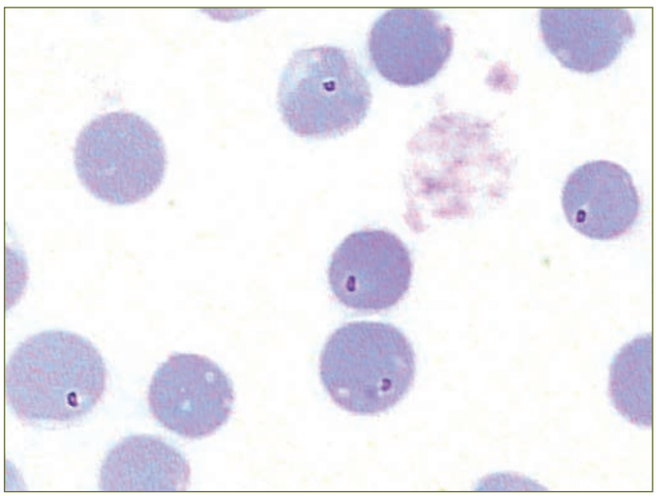


Figura 3.64 Corpos de Heinz (*setas*). Coloração com azul de cresil brilhante (2.000×)

H (três genes α afetados) e síndrome da hidropsia fetal (quatro genes α afetados). O traço talassêmico α^+ heterozigoto (-α/$\alpha\alpha$), também denominado portador silencioso, resulta em uma forma de talassemia praticamente assintomática. A interação das formas α^0 e α^+ (--/-α) resulta na doença da Hb H. Os pacientes portadores dessa forma apresentam 25% a 50% de Hb de Bart ao nascimento e 5% a 30% de Hb H na vida adulta.

As alterações clínicas e laboratoriais são mais graves e caracterizam-se por anemia com dosagem de Hb entre 8,0 e 11,0g/dL, microcitose (VCM entre 55 e 65fL), hipocromia e evidente pecilocitose com hemácias policromáticas e em alvo, icterícia e esplenomegalia (Figuras 3.65 e 3.66).

Os indivíduos com a homozigose da talassemia α^0 (--/--),também denominada hidropsia fetal (forma mais grave das síndromes talassêmicas), geralmente nascem mortos ou morrem logo após o nascimento. Nesses casos, a eletroforese de hemoglobina demostra a presença de quase 100% de Hb de Bart.

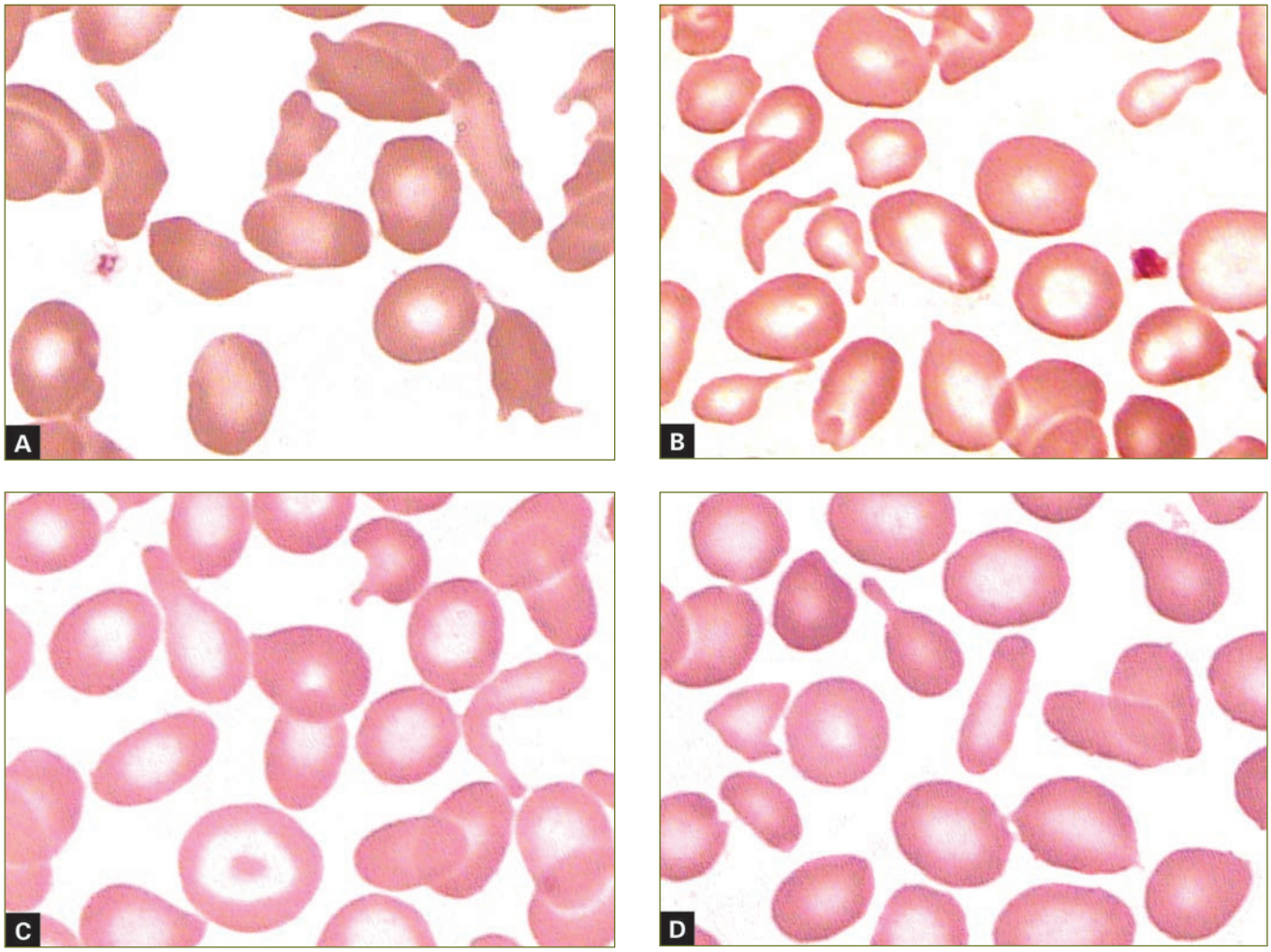


Figura 3.65 (**A** a **D**) Doença da Hb H. Microcitose, hipocromia e evidente pecilocitose (2.000×)

Figura 3.66 Precipitado de Hb H (*setas*) aderido à membrana da hemácia (padrão bola de golfe). Coloração com azul de cresil brilhante (2.000×)

A talassemia alfa tem incidência elevada entre os povos da Ásia, da Oceania, do Oriente Médio e do Mediterrâneo, além de todo o território africano. Na população brasileira, a prevalência do portador silencioso é de, aproximadamente, 10% a 20% e a do traço alfatalassêmico, de 1% a 3%. Em indivíduos afrodescendentes, essa frequência pode alcançar 20% a 25%. Quanto à doença da hemoglobina H, são relatados poucos casos no Brasil.

Talassemia beta

As talassemias beta são formadas por um grupo de doenças causadas pela redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de betaglobina. Estas produzem um acúmulo da cadeia alfa, precipitando e provocando lesões na membrana, além de destruir as hemácias prematuramente. Isso leva a uma anemia de graus variados, de característica microcítica e hipocrômica.

Mutações no gene da betaglobina em heterozigose promovem anemia leve e assintomática denominada talassemia beta

heterozigótica. Mutações em homozigose, dependendo do grau de impedimento da síntese, podem provocar desde uma anemia sintomática moderada (talassemia beta intermediária), que pode exigir transfusões de eritrócitos apenas esporadicamente, até formas graves (talassemia beta maior), as quais são sintomáticas e exigem regime transfusional mensal, na maioria dos casos. Mutações no gene da betaglobina, que suprimem totalmente sua síntese, são chamadas de beta zero.

No esfregaço do sangue periférico dos pacientes portadores da talassemia beta heterozigota, há discreta anemia, com microcitose, pecilocitose e pontilhados basófilos em algumas hemácias. Em virtude da reduzida síntese de hemoglobina, as hemácias são pequenas e de pouco conteúdo hemoglobínico, ou seja, microcíticas e hipocrômicas. A eletroforese das hemoglobinas apresenta uma elevação da Hb A_2 com valores superiores a 3,5% (Figuras 3.67 e 3.68).

Nos pacientes que apresentam homozigose, geralmente as alterações hematológicas são graves. A anemia costuma apresentar uma Hb inferior a 6g/dL (evidente hipocromia), intensa pecilocitose, esquizócitos, hemácias em alvo, hemácias em lágrima e eritroblastos circulantes, além de grânulos basofílicos. Quando há hiperesplenismo, pode ocorrer leucopenia ou plaquetopenia.

Obtém-se o diagnóstico pela eletroforese da hemoglobina, que mostra apenas as hemoglobinas fetal e A_2 quando o genótipo é β^0/β^0 e estas com uma quantidade variável de Hb A quando o genótipo é β^0/β^+ ou β^+/β^+. Na maioria das vezes, a dosagem de bilirrubina indireta está elevada, bem como a ferritina sérica.

ENZIMOPATIAS ERITROCITÁRIAS

A hemácia é composta por 95% de hemoglobina e apenas 5% por enzimas e glicose. A maioria das enzimopatias eritrocitárias consiste em deficiências enzimáticas na via glicolítica de Embden-Meyerhof, que ocorre em quase todos os seres vivos, sendo a principal via metabólica para a obtenção de energia na forma de ATP, lactato e potencial redutor NAD (nicotidamida adenina dinucleotídio), pela degradação da glicose. Após o término da glicólise começa o ciclo de Krebs em organismos aeróbicos, porém, ao final da glicólise, se houver carência de

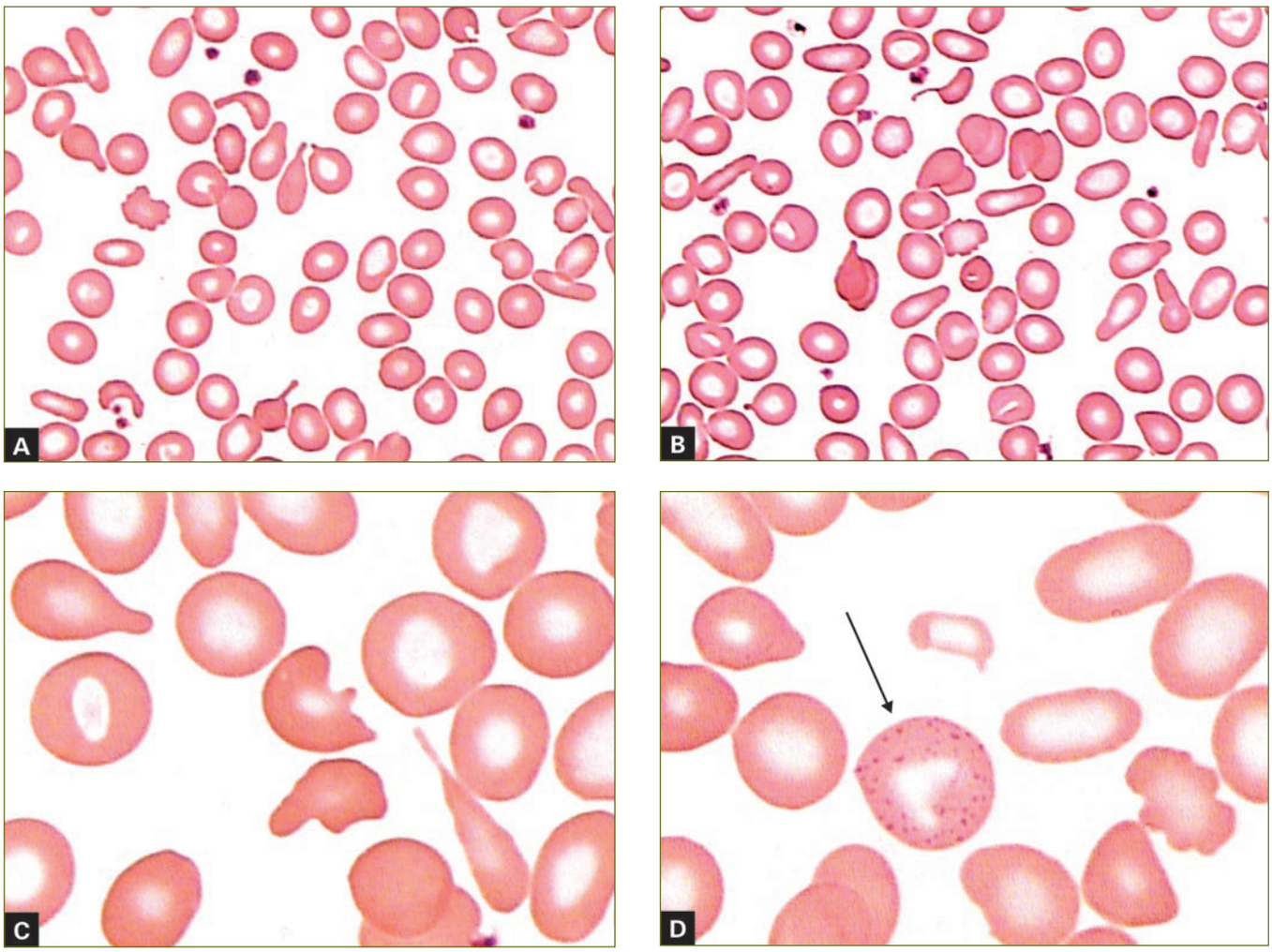


Figura 3.67 (**A** a **D**) Talassemia beta menor. Discreta anemia com microcitose, pecilocitose e pontilhados basófilos em algumas hemácias (*seta*) (2.000×)

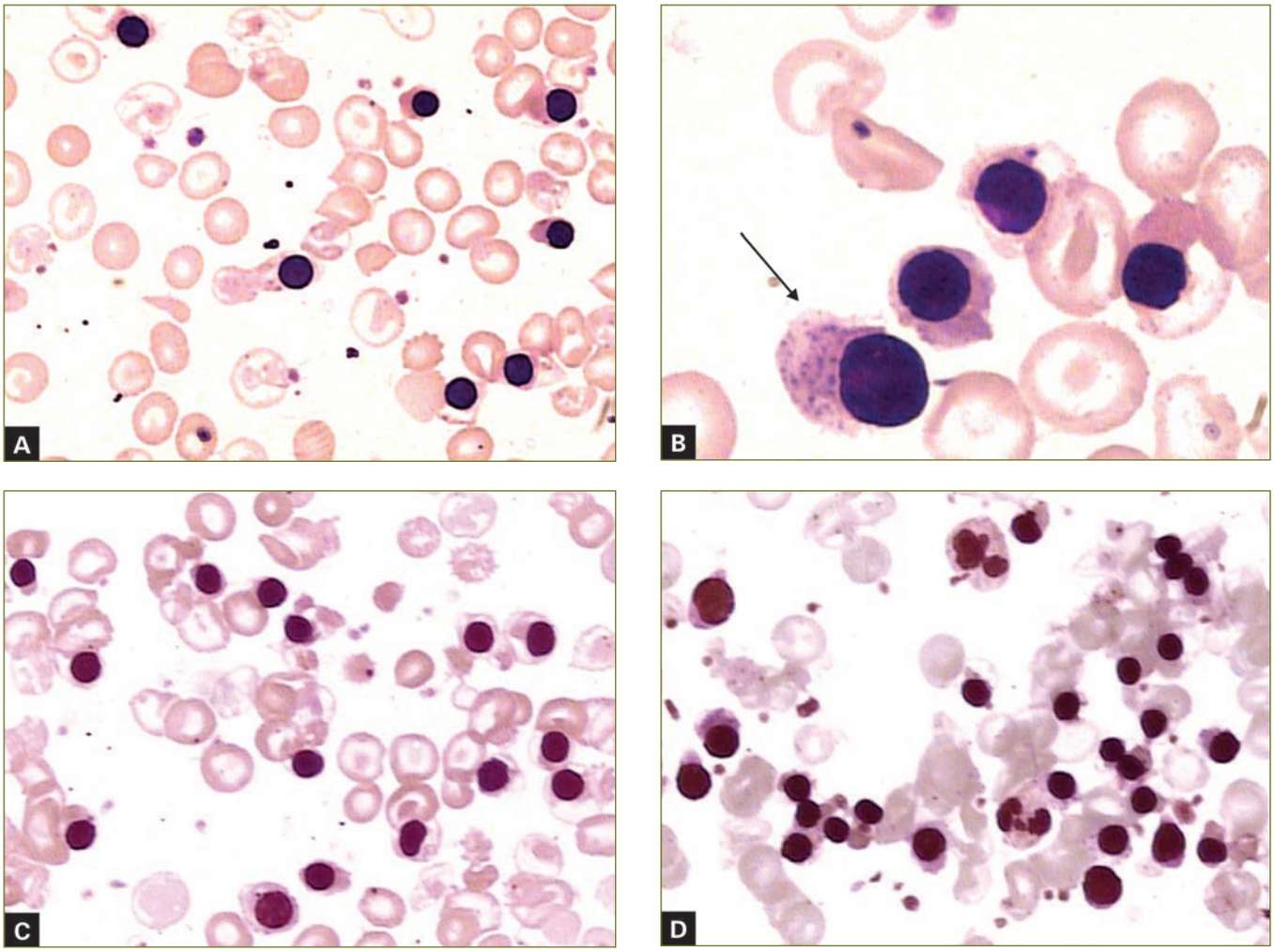


Figura 3.68 (**A** a **D**) Talassemia beta maior. Evidente hipocromia, intensa pecilocitose, esquizócitos, hemácias em alvo e eritroblastos circulantes, com grânulos basofílicos (*seta*) (2.000×)

oxigênio, o piruvato é transformado em lactato, como na hemácia.

DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE

Esta é a deficiência enzimática eritrocitária mais comum, atingindo 3% de toda população mundial. O gene que promove a deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PD) encontra-se no cromossomo X. Logo, as mulheres heterozigotas não apresentam sinais clínicos da doença, pois o gene não afetado compensa a deficiência do outro. Assim, a maioria dos casos ocorre nos homens (homozigotos). A deficiência da enzima G-6-PD é mais frequente em africanos, negros norte-americanos, afrocaribenhos e populações do Mediterrâneo.

No mecanismo da doença, ao entrar na hemácia, a glicose é metabolizada pela via glicolítica de Embden-Meyerhof. No entanto, quando em estado de "estresse oxidativo" causado por ingestão de medicações ou por algum alimento oxidante, é ativada outra via de metabolismo da glicose – conhecida como "ciclo ou via das pentoses", "desvio das pentoses" ou "*shunt* das pentoses". Nessa via, não se forma o potencial redutor e assim ocorre oxidação. Isso leva à formação de corpos de Heinz, partículas sólidas formadas pela desnaturação da hemoglobina oxidada que aderem à membrana da hemácia, provocando várias alterações morfológicas como formação de queratócitos, hemácias irregularmente contraídas e hemácias em bolha.

A G-6-PD é uma enzima que pertence à via das pentoses e protege a hemácia de danos oxidativos. Em condições de estresse, o paciente com deficiência de G-6-PD não é capaz de gerar o potencial redutor NADH. Desse modo, ocorre oxidação em vários compostos celulares, formando corpos de Heinz e aumentando os níveis de Ca^{+}, o que promove a destruição da hemácia.

O paciente portador da deficiência de G-6-PD apresenta uma variação muito grande de manifestações clínicas durante um episódio de crise hemolítica. As mais frequentes são fadiga, fraqueza, mal-estar, dor abdominal e icterícia. Geralmente, os episódios de crise hemolítica aguda são curtos, pois a atividade da enzima G-6-PD das novas hemácias produzidas que chegam à corrente sanguínea é normal.

Existem numerosas variantes de G-6-PD. As mais comuns são as variantes B, A^-, A^+ e a variante Mediterrâneo – conhecida também por variante B^-. Os pacientes de origem africana são quase todos portadores do tipo variante A^-, geralmente sem manifestações clínicas. No entanto, quando expostos a várias substâncias, podem apresentar hemólise aguda. O "favismo", ou hemólise aguda por ingestão de fava, ocorre nos portadores da variante Mediterrâneo que têm atividade enzimática muito pequena com reações hemolíticas muito mais graves, se comparadas com a dos portadores da variante A^-.

Alguns medicamentos podem desenvolver o estresse oxidativo por deficiência da G-6-PD, como o antimalárico (primaquina), as sulfonamidas (principalmente a dapsona), o ácido acetilsalicílico, a nitrofurotoína, as medicações anti-inflamatórias não esteroides, a quinidina e a quinina. A deficiência de G-6-PD provoca anemia hemolítica não esferocítica e, no esfregaço do sangue periférico, quando ocorre um episódio de estresse oxidativo, são comuns achados como anisocitose, policromasia, hemácias irregularmente contraídas, queratócitos, hemácias em bolha e picnócitos (Figura 3.69).

DEFICIÊNCIA DE PIRUVATOCINASE

É uma deficiência enzimática do penúltimo degrau da via glicolítica de Embden-Meyerhof. A deficiência de piruvatocinase, além de interromper o ciclo de formação do potencial redutor NAD, diminui a produção de ATP, promovendo rigidez na hemácia. Assim, ocorrem alterações morfológicas que levam precocemente à lise da célula.

Trata-se, ainda, de uma doença hereditária autossômica recessiva que causa anemia hemolítica não esferocítica. Os pacientes heterozigotos não apresentam sinais clínicos nem hematológicos da deficiência, porém os homozigotos apresentam uma gravidade de anemia hemolítica que varia muito, com dosagens de hemoglobina entre 4 e 10mg/mL. Contudo, os sintomas são relativamente leves, pois nessa deficiência enzimática ocorre aumento de 2,3 DPG (2,3 difosfatocerato) intracelular. Tal aumento faz com que a dissociação do oxigênio da hemoglobina diminua.

Nas deficiências enzimáticas eritrocitárias, geralmente ocorre formação de corpos de Heinz. Já na deficiência de piruva-

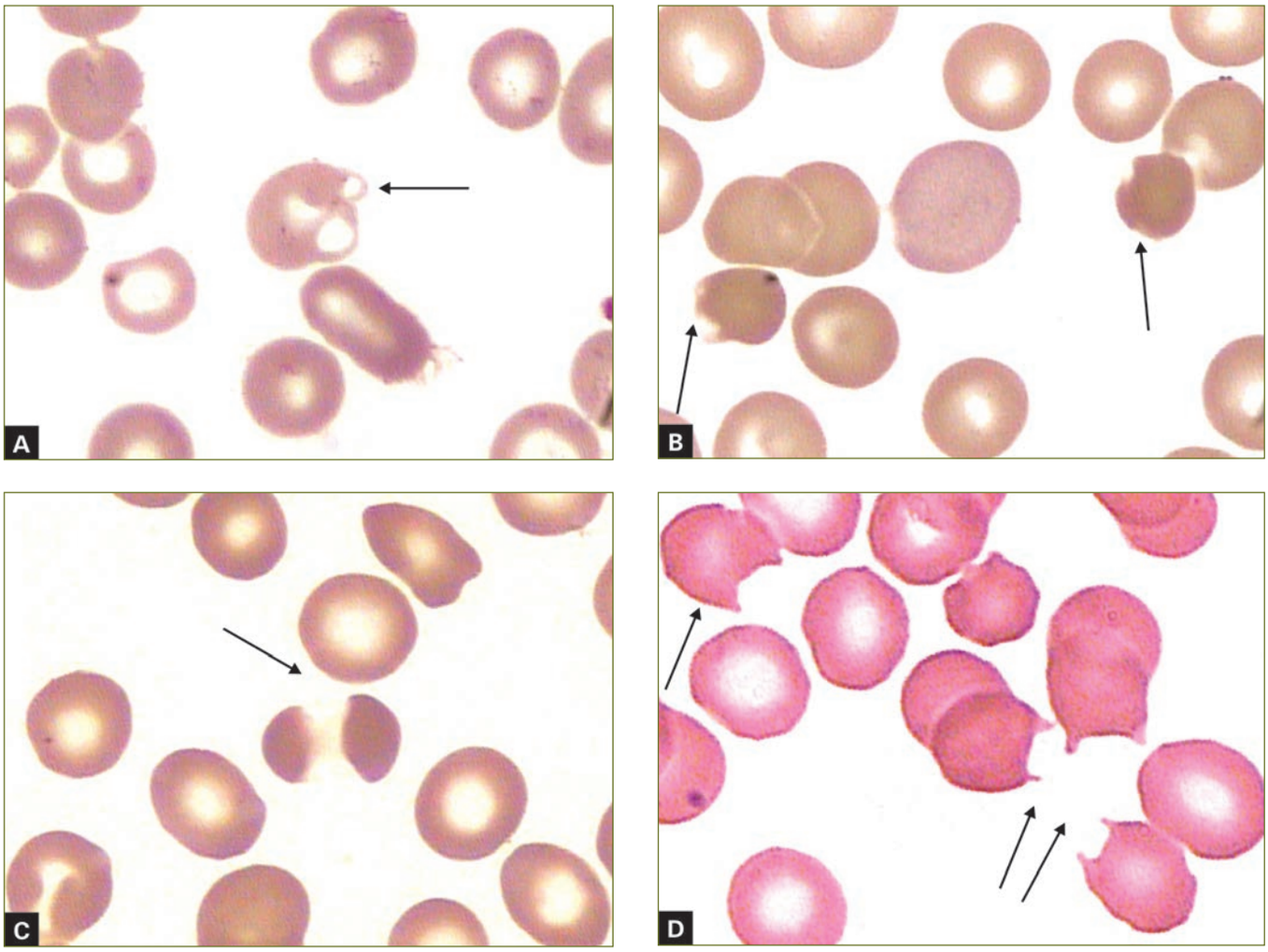


Figura 3.69 (**A** a **D**) Deficiência da enzima G-6-PD. Hemácia em bolha (*seta*) (**A**); hemácias irregularmente contraídas (*setas*) (**B**); queratócitos (*seta*) (**C**); e picnócito (*setas*) (**D**)

tocinase, essa formação não ocorre. São comuns o surgimento de icterícia clínica e frequentes cálculos vesiculares durante a doença.

No sangue periférico, os pacientes portadores da deficiência de piruvatocinase apresentam discreta anisocitose e pecilocitose, mas, após esplenectomia, é comum encontrar no esfregaço sanguíneo acantócitos, hemácias crenadas, evidente policromasia com reticulocitose chegando até 90%, macrocitose eritrocitária e, em alguns casos, eritroblastos circulantes (Figuras 3.70 e 3.71).

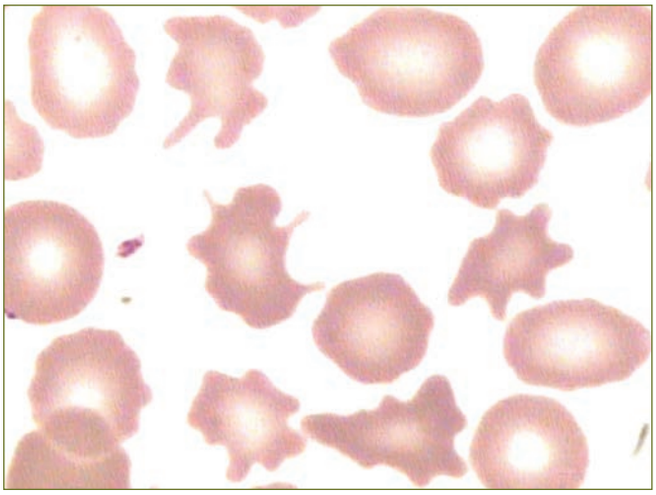


Figura 3.70 Deficiência de piruvatocinase: acantócitos (2.000×)

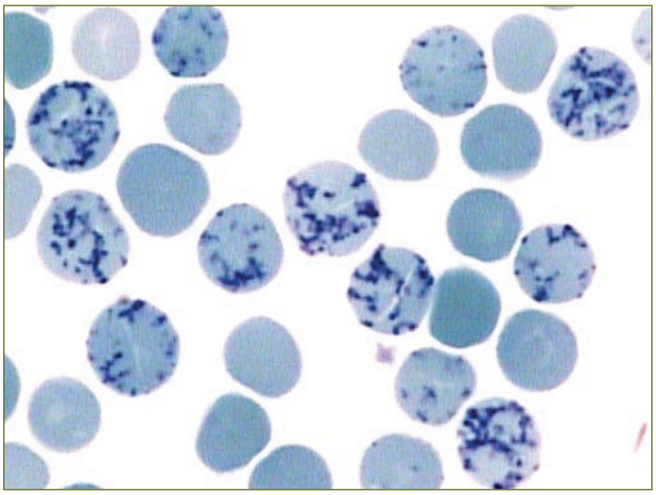


Figura 3.71 Deficiência de piruvatocinase: evidente reticulocitose. É observada apenas por meio de coloração com azul de cresil brilhante (1.200×)

DEFICIÊNCIA DE PIRIMIDINA 5′-NUCLEOTIDASE

A pirimidina 5′-nucleotidase é uma enzima que não pertence à via glicolítica de Embden-Meyerhof como as outras citadas neste capítulo. Sua deficiência é autossômica e recessiva e provoca anemia hemolítica crônica.

O ácido ribonucleico (RNA), quando é degradado no reticulócito em nucleotídios pirimidina, deve ser desfosforilado pela enzima pirimidina 5′-nucleotidase para poder atravessar a membrana da hemácia. Na deficiência de pirimidina 5′-nucleotidase, ocorre acúmulo de pirimidina por degradação danificada do RNA, o que resulta em um evidente surgimento de pontilhado basófilo nas hemácias.

O envenenamento por chumbo inibe a atividade enzimática da pirimidina 5′-nucleotidase, promovendo uma deficiência adquirida. Essa inibição também forma acentuados pontilhados basófilos por acúmulo de pirimidina (Figura 3.72). Nos pacientes portadores dessa deficiência, a contagem de reticulócitos geralmente fica em torno de 10%.

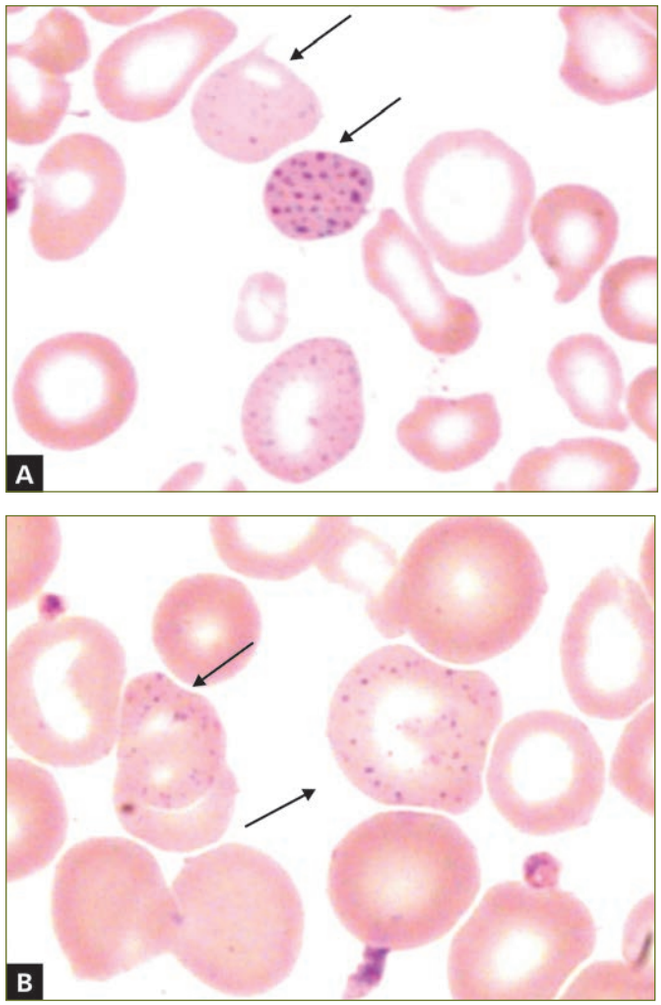


Figura 3.72 (**A** e **B**) Deficiência de pirimidina 5′-nucleotidase; pontilhados basófilos (*setas*) (2.000×)

OUTRAS DEFICIÊNCIAS DE ENZIMAS GLICOLÍTICAS

As deficiências de outras enzimas glicolíticas da via de Embden-Meyerhof são mais raras e, quando graves, podem também produzir anemia hemolítica. Na via das pentoses, também podem ocorrer outras deficiências enzimáticas, como a da gamaglutamil-cisteína-sintetase e da glutationa-sintetase, que

são enzimas envolvidas na síntese de glutationa. No mesmo mecanismo da deficiência de G-6-PD, a hemólise aumenta quando há exposição a substâncias oxidantes ou alguns alimentos nessas disfunções.

Algumas deficiências enzimáticas não provocam anemia hemolítica e também não apresentam manifestações clínicas, como na deficiência de glutationa peroxidase, glutationa-redutase, 6-fosfogliconato e desidrogenase lática.

A deficiência das enzimas 2,3 DPG mutase e fosfatase provocam eritrocitose, ao contrário das demais citadas, que produzem anemia hemolítica.

ANEMIA HEMOLÍTICA CAUSADA POR ANORMALIDADES NA MEMBRANA CELULAR

A membrana da hemácia é responsável pela integridade e pela grande elasticidade da célula. É constituída por fosfolipídios, colesterol não esterificado, glicolipídios e proteínas. Os fosfolipídios, a fosfatidilcolina e a esfingomielina estão presentes de maneira simétrica na porção externa da bicamada lipídica. Na camada interna da membrana, são encontrados os fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Quando estes fosfolipídios de membrana interna estão na superfície da membrana, induzem a ativação da coagulação e da adesão dos macrófagos, podendo levar à lise da hemácia.

As proteínas de membrana da hemácia são classificadas por nomenclatura numérica, de acordo com sua mobilidade na eletroforese em gel de poliacrilamida. São classificadas em dois grupos: integrais e periféricas. As proteínas integrais atravessam toda a dupla camada lipídica, constituída pela banda 3 e pelas glicoforinas. As proteínas periféricas formam o citoesqueleto.

O citoesqueleto da hemácia está localizado logo abaixo da camada lipídica e é fundamental para manter a forma bicôncova e a flexibilidade da célula. Basicamente, consiste em espectrina alfa e beta, anquirina (banda 2.1), filamentos curtos de actina (banda 5), tropomiosina (banda 7) e proteínas 4.1 e 4.2.

ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA

É a anemia hemolítica congênita mais comum do norte da Europa. Além disso, apresenta uma frequência de 1 para cada 5.000 pessoas nos EUA, enquanto no Brasil este índice ainda é mais alto, aproximando-se de 1 para cada 1.000 pessoas.

A esferocitose hereditária é causada pela alteração qualitativa ou quantitativa de proteínas de membrana das hemácias, provocadas por alterações genéticas, das quais 75% dos casos são autossômicos dominantes e 25%, autossômicos recessivos. Um estudo com 25 pacientes com esferocitose hereditária revelou que, em 72% dos casos, houve deficiência da proteína anquirina. Logo após, vinha a proteína banda 3 com 20% de deficiência, seguida da proteína 4.2 e da espectrina com deficiência de 4%.

A expressão da anemia hemolítica é bastante heterogênea, variando de formas assintomáticas até as graves. A anemia hemolítica na esferocitose hereditária pode surgir no primeiro ano de vida ou até em idosos.

Os pacientes portadores de esferocitose hereditária podem apresentar no quadro hemolítico: fadiga, palidez cutâneo-mucosa, icterícia e esplenomegalia. A longo prazo, podem ser formados cálculos de vesículas.

No esfregaço do sangue periférico, observam-se numerosos esferócitos (contagem superior a 25%) e hemácias policromáticas (Figura 3.73). No eritrograma, o índice hematimétrico CHCM está bastante elevado e a contagem de reticulócitos muito aumentada, devido ao maior número de hemólises.

O teste de fragilidade osmótica apenas comprova a existência de hemácias osmoticamente frágeis na amostra, porém não consegue diferenciar a esferocitose hereditária de outras esferocitoses, bem como da anemia hemolítica autoimune.

ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA

Uma série de anormalidades genéticas pode resultar na eliptocitose hereditária e em todas elas o citoesqueleto da hemácia perde sua integridade. A proteína de membrana da hemácia mais afetada nesta anormalidade é a espectrina.

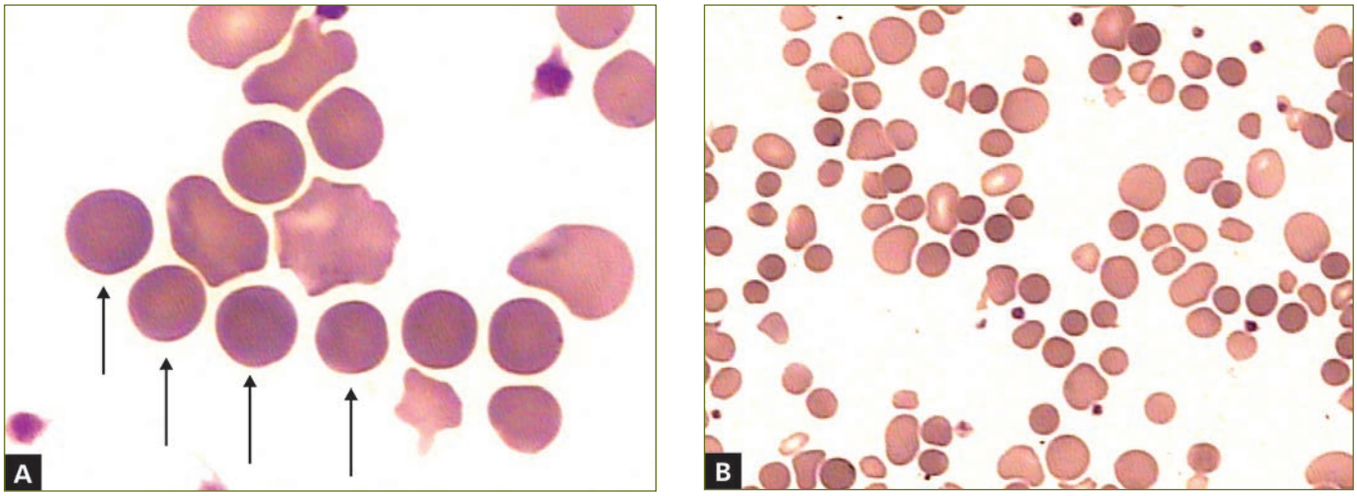


Figura 3.73 (**A** e **B**) Esferocitose hereditária. Os esferócitos destacam-se pela coloração intensa laranja-avermelhada (*setas*) (2.000×)

Muitos grupos étnicos são mais acometidos pela eliptocitose hereditária, entre eles os caucasianos, chineses, japoneses e indianos, porém nos africanos ocidentais a incidência é ainda maior, com aproximadamente seis pacientes portadores de eliptocitose hereditária para cada 1.000 pessoas.

A eliptocitose hereditária pode se apresentar durante o período neonatal, desenvolvendo uma anemia moderada com hiperbilirrubinemia, conhecida como hemólise eliptocítica hereditária ou se apresentar como uma leve anemia assintomática. Clinicamente, a apresentação da eliptocitose hereditária é muito variável.

No sangue periférico, é muito importante quantificar os eliptócitos em percentagem. Isso porque uma contagem superior a 75% sugere eliptocitose homozigota (Figura 3.74).

OVALOCITOSE HEREDITÁRIA

A ovalocitose hereditária é uma anemia hemolítica rara causada por uma herança autossômica dominante. Uma deleção no gene da proteína de membrana banda 3 causa uma excessiva firmeza na ligação com a proteína anquirina, produzindo a redução da mobilidade celular e o aumento da rigidez da membrana. Tal alteração ocorre na anemia "ovalocitose do sudeste asiático", também conhecida como eliptocitose estomatocítica e ovalocitose hereditária dos melanésios, comum na Malásia, na Indonésia, nas Filipinas e na região da Melanésia, na Oceania.

Geralmente, a ovalocitose hereditária é assintomática. Devido à sua rigidez na membrana celular, estas hemácias têm resistência para a infestação do *Plasmodium* da malária, como ocorre também com as hemácias falciformes.

Os ovalócitos podem surgir em outras enfermidades, como nas síndromes mielodisplásicas e na anemia megaloblástica. No entanto, na ovalocitose do sudeste asiático, alguns ovalócitos apresentam-se como estomatócitos e com estomas em diversas formas.

No sangue periférico, além dos ovalócitos, é comum encontrar "macrócitos estomatócitos" (Figura 3.75). A dosagem de hemoglobina e os índices hematimétricos permanecem normais nos pacientes portadores dessa anemia hemolítica.

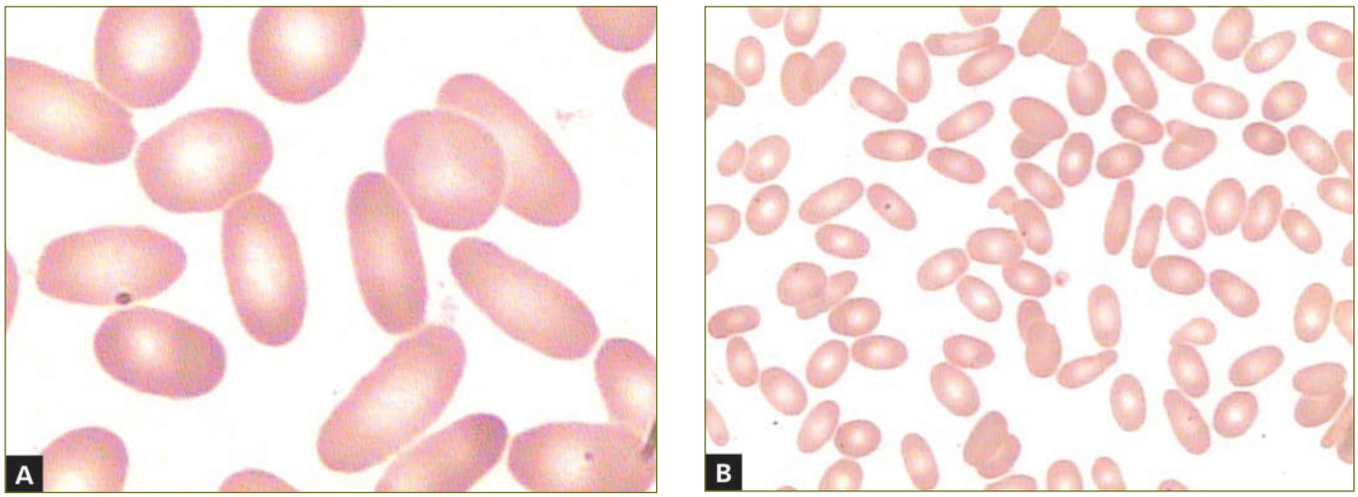


Figura 3.74 (**A** e **B**) Eliptocitose hereditária (2.000×)

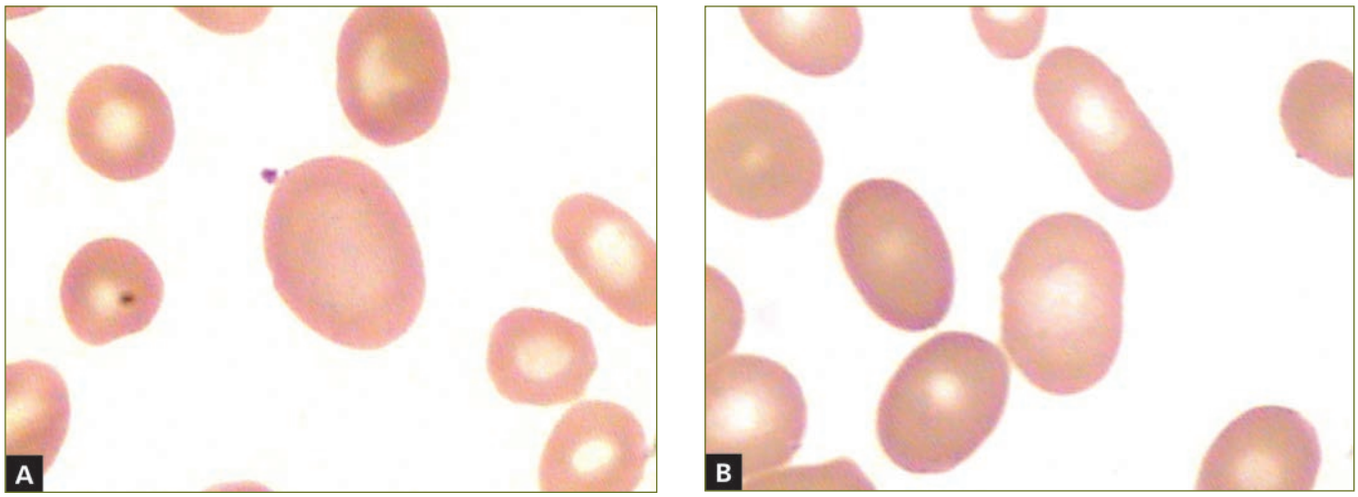


Figura 3.75 (**A** e **B**) Ovalocitose hereditária (2.000×)

PIROPOIQUILOCITOSE HEREDITÁRIA

É uma anemia hemolítica causada pela deficiência parcial da proteína de membrana espectrina e por um defeito na autoagregação dos dímeros da espectrina em tetrâmeros. É uma forma grave de eliptocitose ou ovalocitose hereditária que predomina nas populações de caucasianos, negros e árabes.

A piropoiquilocitose hereditária pode causar anemia neonatal com hiperbilirrubinemia e icterícia. O diagnóstico da doença fica bastante difícil nesse período pela necessidade de transfusões sanguíneas, mas, após o primeiro ano de vida, a doença torna-se menos grave. Assim, não é necessário mais transfusões sanguíneas.

A denominação "piropoiquilocitose" deve-se ao aumento da fragmentação das hemácias ao aquecimento *in vitro* em temperaturas mais baixas que no caso das hemácias normais. Todavia, alguns autores definem a alteração morfológica das hemácias com semelhança a "fagulhas" de uma fogueira.

No sangue periférico, observa-se uma grave anisocitose com índices de RDW muito altos, além de a poiquilocitose ser evidente com formas de hemácias em lágrima, fragmentos de hemácias, microesferócitos e eliptócitos, entre outras formas bizarras (Figura 3.76). Os índices hematimétricos VCM e HCM estão bastante baixos, enquanto a contagem de reticulócitos está aumentada. Em outras condições, tais como deseritropoese congênita e na doença da Hb H, por vezes pode haver um quadro morfológico periférico muito semelhante ao da piropoiquilocitose hereditária.

ESTOMATOCITOSE HEREDITÁRIA

É um grupo raro de anemias hemolíticas genéticas com herança autossômica dominante, que tem como consequência a deficiência da proteína de membrana banda 7.2. Tal deficiência proporciona um desequilíbrio no fluxo de cátions na hemácia, aumentando o sódio e diminuindo o potássio intracelular. Após esse descontrole de cátions, as hemácias são intumescidas e tornam-se "hidrócitos" com morfologia no esfregaço do sangue periférico de estomatócitos.

A estomatocitose hereditária tem muitas características semelhantes no esfregaço do sangue periférico com a "doença do Rh nulo". Ambas apresentam contagem de estomatócitos entre 10% a 30% e alguns esferócitos. Contudo, o diagnóstico diferencial poderá ser obtido com a realização do teste de Rh, revelando a total falta de antígenos na "doença do Rh nulo".

No sangue periférico, a contagem de estomatócitos característicos ultrapassa os 25% e outras formas raras de estoma

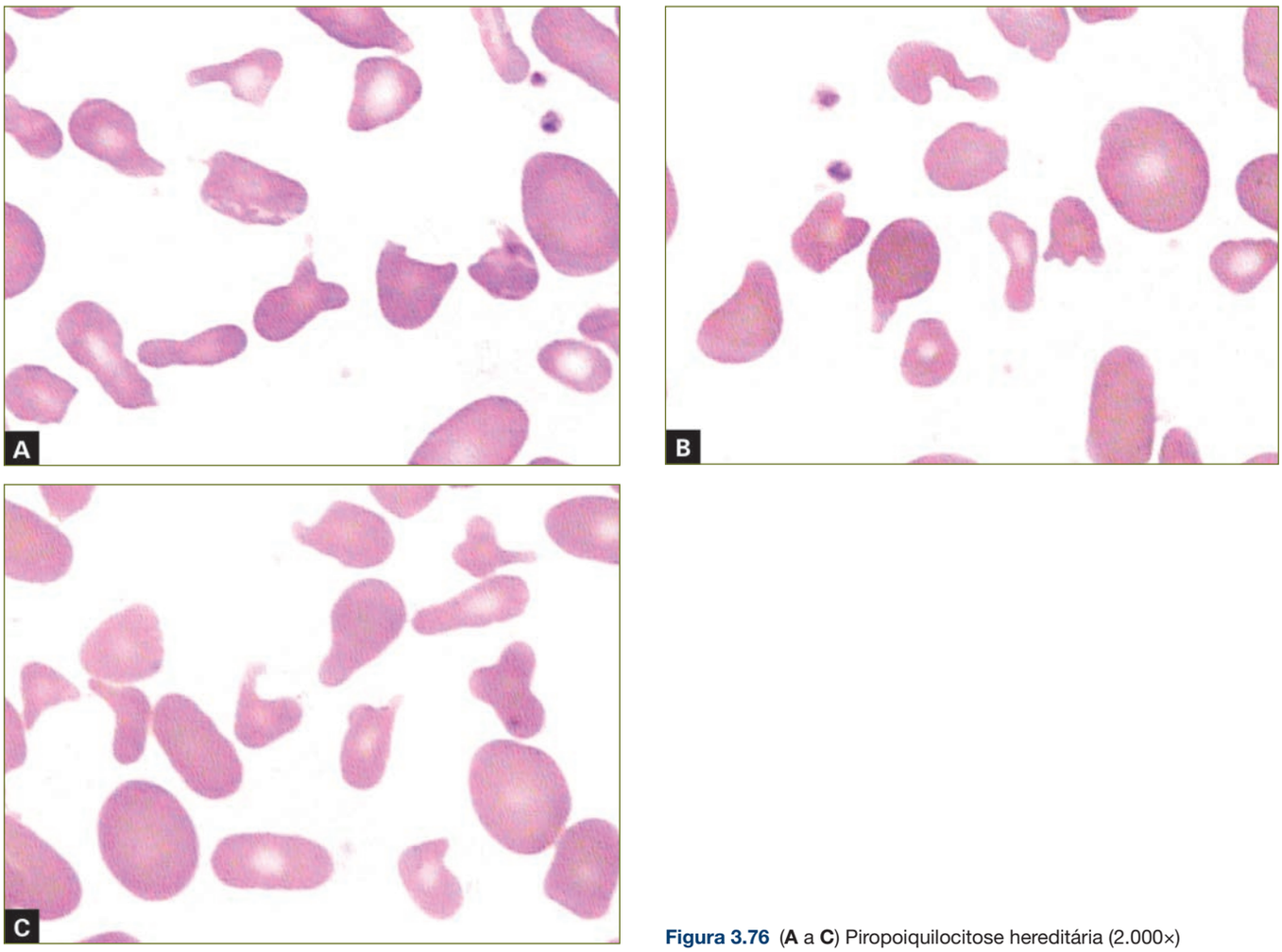


Figura 3.76 (**A** a **C**) Piropoiquilocitose hereditária (2.000×)

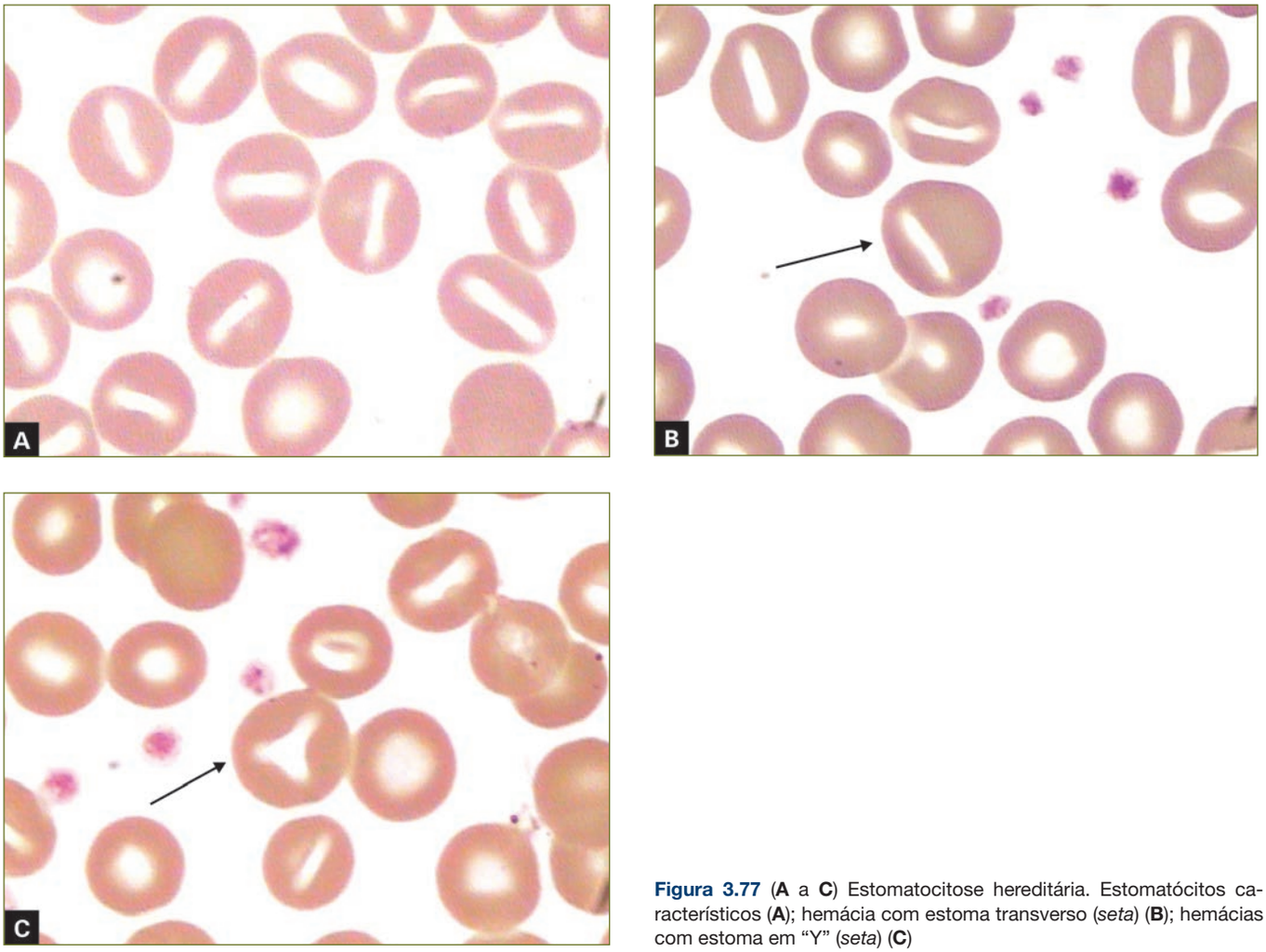


Figura 3.77 (**A** a **C**) Estomatocitose hereditária. Estomatócitos característicos (**A**); hemácia com estoma transverso (*seta*) (**B**); hemácias com estoma em "Y" (*seta*) (**C**)

também são observadas, como as hemácias com estoma em "Y" e aquelas com estoma transverso (Figura 3.77). Ocasionalmente, pode ocorrer pontilhado basófilo. Geralmente, no hemograma o índice VCM está aumentado e o CHCM, diminuído.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS ADQUIRIDAS NÃO IMUNES

HEMOGLOBINÚRIA PAROXÍSTICA NOTURNA

A hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é uma anemia hemolítica crônica rara, de caráter clínico extremamente variável, também conhecida como doença de Marchiafava e Michelli. Esta anemia acomete ambos os sexos igualmente, bem como todas as etnias. Nela, também não há predisposição familiar. Geralmente, apresenta-se com um quadro de anemia hemolítica, com infecções recorrentes, neutropenia e trombocitopenia. A HPN é considerada um tipo de trombofilia adquirida, podendo se apresentar com trombose venosa e com ocorrência maior nas veias hepáticas e intra-abdominais.

Na maioria das vezes, a HPN surge em associação a outras doenças hematológicas, como as síndromes mielodispásicas, a anemia aplásica e a insuficiência medular. Antigamente, o diagnóstico era feito com a demonstração da sensibilidade anormal das hemácias pela ação lítica do sistema complemento, pelo teste de Ham. Hoje em dia, por meio da citometria de fluxo e da biologia molecular, foi evidenciado que a HPN não era apenas uma anemia hemolítica adquirida, e sim um defeito mutacional clonal da célula-tronco hematopoética.

A mutação que provoca a HPN ocorre no gene da fosfaditilinositolglicana classe-A e resulta no bloqueio precoce da síntese de âncoras de glicosilfosfaditilinositol (GPI), responsáveis por manter aderidas à membrana plasmática dezenas de proteínas com funções específicas. A deficiência em sintetizar GPI leva à redução de todas as proteínas de superfície normalmente ancoradas por ela. Entre elas, estão o CD55 – também conhecido como *decay accelerating factor* (DAF) – e o CD59, denominado *membrane inhibitor of accelerating factor* (MIRL), que controlam a ativação da cascata do complemento. Assim, ocorre um aumento da suscetibilidade da hemácia ao complemento, promovendo hemólise.

No esfragaço do sangue periférico dos pacientes portadores de HPN, observa-se um quadro hemolítico leve, com hemácias policromáticas, neutropenia e trombocitopenia (Figura 3.78). No

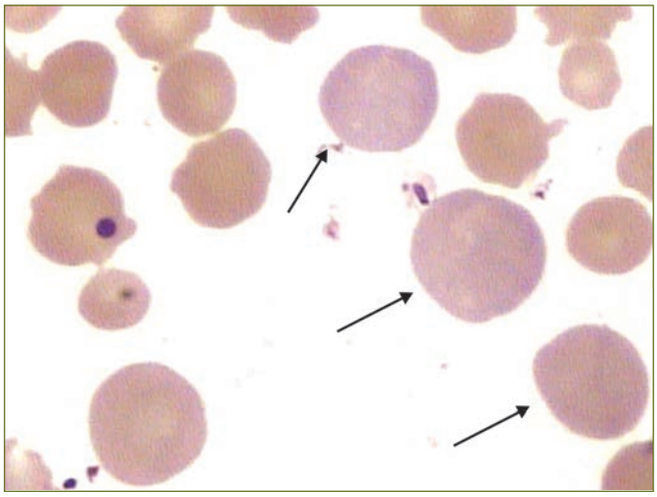


Figura 3.78 Hemoglobinúria paroxística noturna: policromasia (*setas*) (2.000×)

estudo imuno-hematológico, o teste de Coombs é negativo. Durante os surtos de hemólise intravascular aguda (paroxismos), ocorre hemoglobinúria, notada por uma urina de coloração marrom-escura.

ANEMIA HEMOLÍTICA MICROANGIOPÁTICA

A anemia hemolítica microangiopática é provocada por um traumatismo mecânico nos capilares sanguíneos (Figura 3.79). Isso leva à fragmentação das hemácias, produzindo pecilócitos específicos desta anemia hemolítica (esquizócitos em capacete, fragmentos de hemácias e hemácias pinçadas). Nesta anemia de grau variado, é comum a reticulocitose e níveis de bilirrubina indireta e DHL aumentados. Pode ocorrer também trombocitopenia. O quadro clínico varia de acordo com a etiologia da anemia hemolítica microangiopática. É necessário pesquisar sua etiologia, pois todas as causas são doenças extremamente graves, com tratamentos distintos. As etiologias das anemias hemolíticas microangiopáticas são:

- **Síndrome HELLP**: ocorre em pacientes gestantes e é caracterizada pelo grau avançado de hipertensão gestacional e hemólise. Os níveis das transaminases estão elevados e, geralmente, ocorre plaquetopenia, podendo haver ou não coagulação intravascular disseminada (CIVD).
- **Púrpura trombocitopênica trombótica**: não ocorre clivagem dos multímeros de alto peso molecular do fator von Willebrand (FvW) pela enzima ADAMTS-13. Isso causa um acúmulo do FvW nos capilares sanguíneos, consumindo

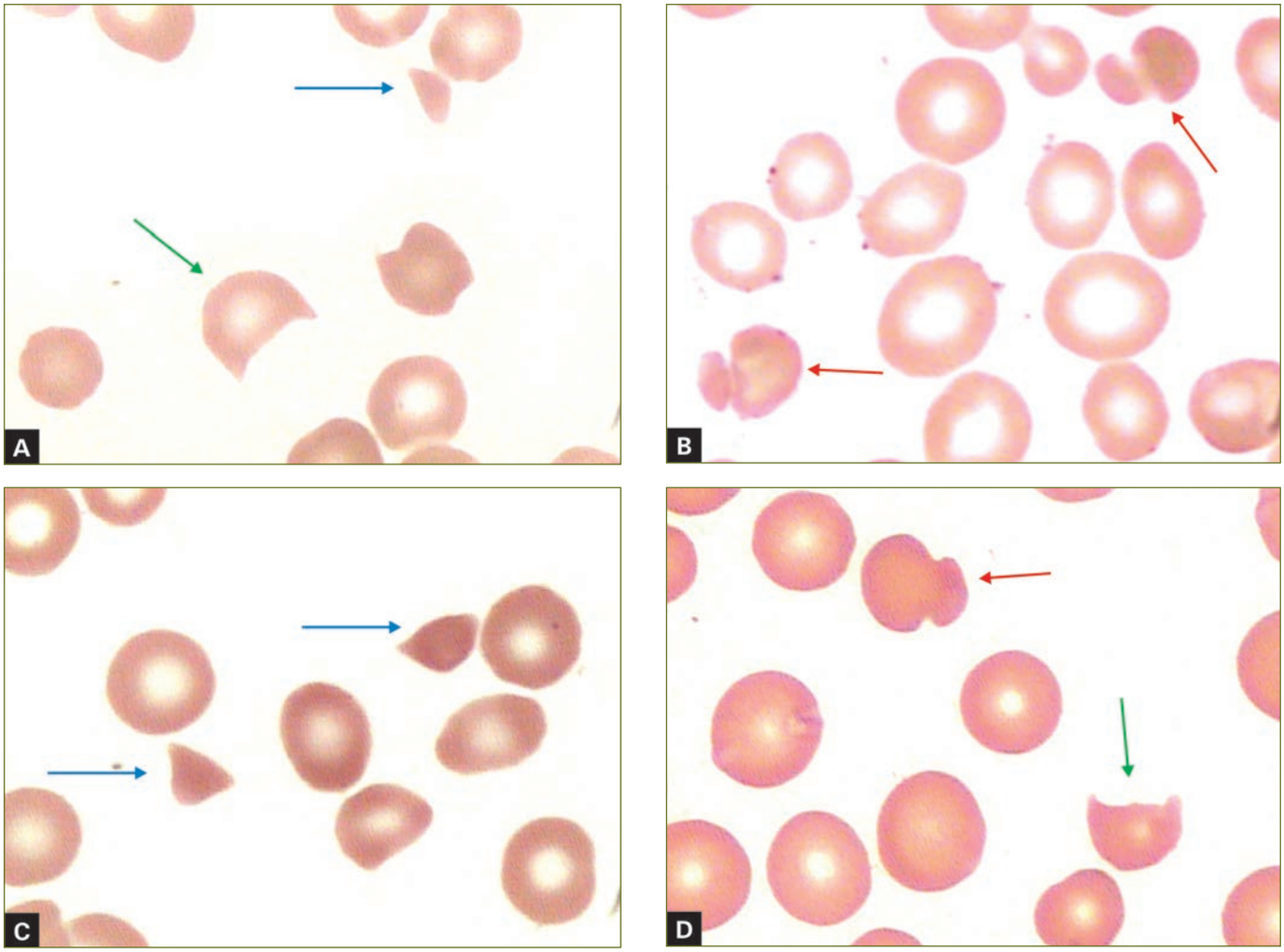


Figura 3.79 (**A** a **D**) Anemia hemolítica microangiopática. Esquizócitos em capacete (*setas verdes*), fragmentos de hemácias (*setas azuis*) e hemácias pinçadas (*setas vermelhas*) (2.000×)

plaquetas por agregação plaquetária. Podem ocorrer alterações clínicas neurológicas, febre e insuficiência renal aguda. Em geral, o quadro de CIVD não está associado.

- **Síndrome hemolítica urêmica**: nas infecções prévias por *Escherichia coli* e *Shigella dysenteriae*, pode ocorrer acúmulo da toxina nas células endoteliais glomerulares devido ao receptor Gb3. Desse modo, há uma estimulação das células endoteliais para secretar FvW de maneira aumentada, promovendo agregação plaquetária nos vasos glomerulares. Assim, é observado, além da anemia hemolítica microangiopática e plaquetopenia, uma insuficiência renal.
- **CIVD**: nesta patologia, a anemia hemolítica microangiopática também resulta do acúmulo de fibrina depositado nos capilares. Entretanto, além do quadro laboratorial de hemólise com esquizócitos em capacete, fragmentos de hemácias, hemácias pinçadas e plaquetopenia, existe associada uma coagulopatia de consumo.
- **Hipertensão maligna**: decorre de necrose fibroide nas arteríolas em consequência da hipertensão arterial sistêmica. Além disso, provoca anemia hemolítica microangiopática.

PRÓTESE VALVAR

O implante de próteses valvares não promove a cura definitiva do paciente e ainda está associado a complicações com o componente hemodinâmico. Neste, ocorrem hemólise intravascular crônica com baixa haptoglobina sérica, hemossiderinúria, reticulocitose e anormalidades na membrana das hemácias provocadas pelo turbilhonamento do sangue dentro do coração. Promovendo a formação de fragmentos de hemácias (esquizócitos) quando se chocam contra a superfície irregular (próteses). A hemólise intravascular crônica pode levar à deficiência de ferro, em razão da perda da hemoglobina pela urina. As próteses valvares também estão relacionadas com complicações com a durabilidade e trombogenicidade e podem apresentar endocardite e trombose de prótese. No esfregaço do sangue periférico, é muito comum o surgimento de esquizócitos e policromasia (Figura 3.80).

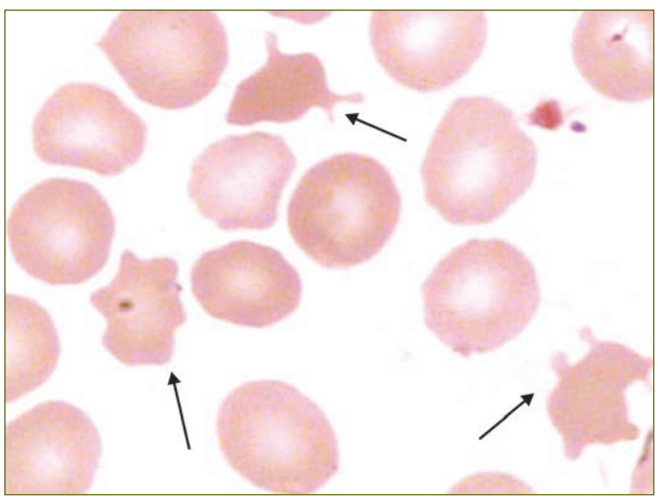


Figura 3.80 Prótese valvar: esquizócitos (*setas*) (2.000×)

MALÁRIA

A malária, ou impaludismo, é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, como o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium falciparum, o Plasmodium malariae* e o *Plasmodium ovale.* Tem como vetores as fêmeas de alguns mosquitos infectados do gênero *Anopheles*. É a maior causa de anemia em muitas partes do mundo. Em humanos, os parasitos (chamados de esporozoítos) deslocam-se até o fígado, no qual se desenvolvem e liberam outra forma, os merozoítos. Esses últimos entram na corrente sanguínea e infectam as hemácias. Os trofozoítos multiplicam-se dentro das hemácias (esquizonte), que se rompem após 48 a 72h, infectando mais hemácias. Desse modo, provocam uma anemia hemolítica adquirida, por vezes muito grave, que pode ser fatal em questão de horas após o aparecimento dos primeiros sintomas. Geralmente, os primeiros sintomas aparecem de 10 dias a 4 semanas depois da infecção, embora eles possam aparecer em apenas 8 dias ou até um ano depois da infecção. Após a manifestação, os sintomas ocorrem, como citado, em ciclos de 48 a 72h. Durante um exame físico, observa-se um aumento do fígado ou do baço. Na pesquisa, os esfregaços sanguíneos devem ser coletados em intervalos de 6 a 12h para confirmar o diagnóstico de malária, com a identificação de suas formas: trofozoítos, esquizontes e gametócitos (Figura 3.81).

ANEMIAS HEMOLÍTICAS AUTOIMUNES

A anemia hemolítica autoimune (AHAI) caracteriza-se pela destruição precoce das hemácias, devido à presença de autoanticorpos fixados a antígenos de superfície da membrana das hemácias. Quando o anticorpo liga-se à hemácia, a natureza do processo hemolítico é determinada pelas classe de anticorpo, densidade e distribuição do antígeno na membrana da mesma. A presença de IgG e a precipitação de C3b do complemento na membrana da hemácia são reconhecidas por macrófagos do sistema reticoendotelial que têm receptores específicos para tais proteínas.

A destruição das hemácias promovida pelos macrófagos representa o principal mecanismo de hemólise extravascular. Quando a ativação do complemento da membrana eritrocitária se estende além do C3b, ocorre uma série de reações que resultam na produção de C5b e no complexo de ataque à membrana, que tem a capacidade de perfurar a membrana da hemácia, provocando o vazamento da hemoglobina e outros componentes do plasma, alterando o equilíbrio osmótico da célula e acarretando a hemólise intravascular.

O diagnóstico da AHAI baseia-se na identificação sorológica dos autoanticorpos e na evidência clínica e laboratorial de hemólise. Os testes laboratoriais têm o propósito de detectar a presença do anticorpo envolvido e, se possível, identificá-lo.

Os testes mais utilizados na abordagem das AHAI são os testes de Coombs direto ou teste direto de antiglobulina (TDA) e pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) ou Coombs indireto. O Coombs direto tem por finalidade a detecção de anticorpos ou componentes do complemento fixado às hemácias. Fundamenta-se na adição do soro de Coombs (antiglobulina

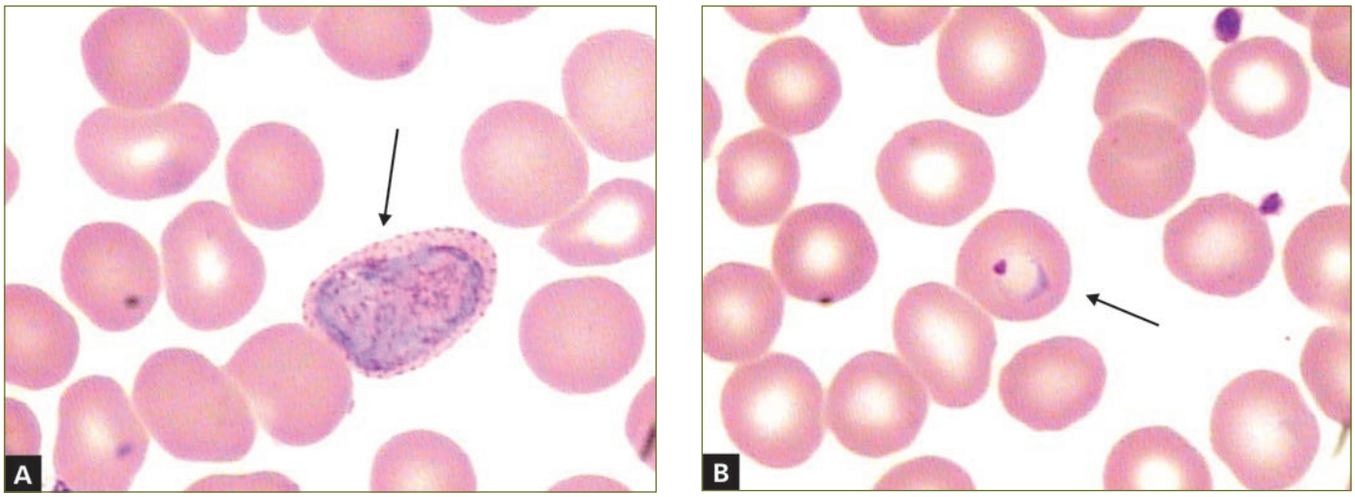


Figura 3.81 (**A** e **B**) Malária. Gametócito (*seta*) (**A**); e trofozoíto (*seta*) (**B**) (2.000×)

humana) ao preparado de hemácias do paciente para potencializar e tornar visível as reações de aglutinação entre as hemácias que têm anticorpos ligados às suas superfícies.

Já o Coombs indireto tem por objetivo pesquisar no soro do paciente a existência de aloanticorpos irregulares voltados contra antígenos clinicamente significantes de importância transfusional e/ou gestacional. Fundamenta-se na reação entre anticorpos presentes no soro do paciente e numa preparação de hemácias conhecidas, mediante potencialização do soro de Coombs. É realizado tanto à temperatura ambiente (fase fria), que detecta principalmente a IgM, quanto após a incubação a 37°C (fase quente), a qual detecta principalmente a IgG.

Outros exames, como hemograma, contagem de reticulócitos, desidrogenase lática (DHL) e pesquisa de autocriaglutininas, também devem ser realizados para a confirmação da AHAI. A AHAI pode ser classificada com base em sua etiologia: idiopática ou primária que não apresenta causa definida; ou secundária, associada a doenças linfoproliferativas, doenças autoimunes e uso de medicamentos, entre outros. Também pode ser classificada de acordo com a temperatura de reatividade dos anticorpos ligados à hemácia.

Na AHAI por anticorpo quente, os autoanticorpos reagem mais fortemente a temperaturas iguais ou superiores a 37°C. Assim, a hemólise ocorre por meio da destruição das hemácias pelo sistema reticuloendotelial. Já na AHAI por anticorpo frio, os autoanticorpos ligam-se às hemácias em temperaturas entre 4°C e 18°C, podendo levar à aglutinação das hemácias na circulação sanguínea, e ao ser ativado o sistema complemento, ocorre a hemólise.

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE POR ANTICORPO QUENTE

A AHAI por anticorpo quente corresponde de 60% a 70% das AHAI e é causada por anticorpos eritrocitários da classe IgG que reagem com maior eficácia a 37°C. Embora não causem diretamente aglutinação eritrocitária, eles induzem a destruição prematura das hemácias pelo sistema reticoendotelial fagocitário (hemólise extravascular). A sensibilização da hemácia por IgG leva à fagocitose parcial no baço e, desse modo, a hemácia perde sua forma bicôncava assumindo uma esférica, que resulta no surgimento de esferócitos.

Dessa forma, a medula óssea responderá à perda das hemácias circulantes elevando a produção de hemácias, detectada pelo aumento de reticulócitos no sangue periférico. Cerca de 30% dos casos são idiopáticos primários e os outros, secundários a doenças linfoproliferativas, doenças autoimunes, infecções, imunossupressão e uso de certas medicações, entre outros.

A doença acomete pacientes de todas as faixas etárias e de ambos os sexos e é mais comum em mulheres adultas, causando anemia variável e esplenomegalia. No hemograma, o sangue periférico apresenta policromasia, anisocitose com RDW elevado e esferócitos, podendo ocorrer eritroblastos circulantes (Figuras 3.82 e 3.83).

O teste da antiglobulina direta (Coombs direto) é positivo, devido à presença de anticorpos da classe IgG. Já o Coombs indireto é negativo.

Nos testes bioquímicos, pode ocorrer aumento da bilirrubina indireta e do DHL, assim como também diminuição da haptoglobina. Quando há associação entre AHAI e trombocitemia autoimune, esse quadro é denominado síndrome de Evans.

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE POR ANTICORPO FRIO

Na AHAI por anticorpo frio, os autoanticorpos são crioaglutininas, geralmente da classe IgM, e reagem com maior intensidade a temperaturas baixas. A maior ação dos autoanticorpos com o frio faz com que as extremidades do organismo sejam mais acometidas. Os sintomas são causados pela aglutinação das hemácias nas extremidades, que levam à redução do fluxo sanguíneo e à diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos nas extremidades, ocasionando o aparecimento do fenômeno

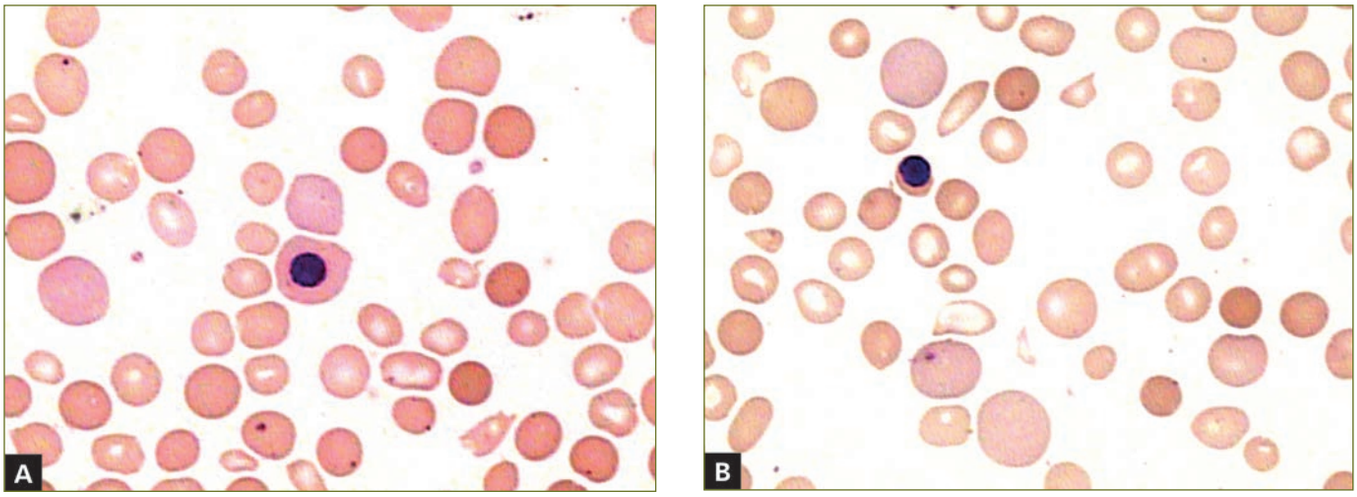


Figura 3.82 (**A** e **B**) Anemia hemolítica autoimune por anticorpo quente. Policromasia, anisocitose, esferócitos e eritroblastos circulantes (2.000×)

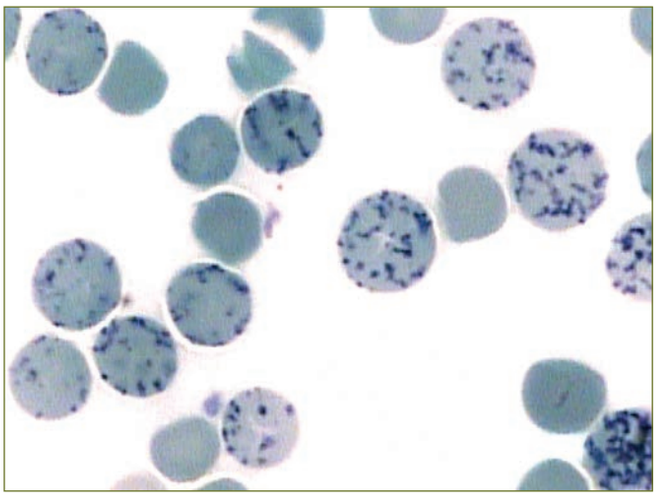


Figura 3.83 Anemia hemolítica autoimune por anticorpo quente: reticulocitose (2.000×)

de Raynaud. Este provoca a aparência cianótica nos dedos, nariz e orelhas dos pacientes com AHAI por anticorpo frio.

Os anticorpos "frios" costumam ser produzidos em resposta a infecções ou por doenças linfoproliferativas. As formas associadas a infecções são de apresentação aguda, mais comuns em pneumonias (por *Mycobacterium pneumoniae*) e em infecções virais (mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr).

A forma mais comum, no entanto, é a idiopática ou primária, conhecida por síndrome da crioaglutinina, que costuma ocorrer na sexta e na sétima décadas de vida. A hemólise que ocorre nessa doença é principalmente extravascular, devido à habilidade dos anticorpos em ligar e ativar o complemento, principalmente o C3b. Embora também talvez haja hemólise intravascular com menor intensidade, podem ocorrer anemia, palidez, fadiga e icterícia.

No hemograma, a citomorfologia do sangue periférico apresenta as hemácias agrupadas, que são responsáveis por falsas elevações do VCM da amostra, como também por valores irreais de HCM e CHCM. Para viabilizar a avaliação dos índices hematimétricos, recomenda-se aquecer a amostra a 37°C por pelo menos 15min, sendo possível estender o tempo de aquecimento de acordo com o grau de aglutinação das hemácias.

Em alguns pacientes, observam-se hemácias em forma de roseta e aumento do RDW e da contagem de reticulócitos. O teste de Coombs direto é positivo (quando utilizado o soro monoespecífico para complemento), e o Coombs indireto negativo. Nos testes bioquímicos, as taxas de bilirrubina indireta e DHL estão elevadas.

O tratamento da AHAI por anticorpo frio é manter o paciente aquecido e, nos casos de hemólise grave, mesmo com resposta fraca ao corticosteroide, deve-se manter o esquema de imunossupressão visando a uma possível hemotransfusão de urgência. As crioaglutininas também podem ser observadas na hemoglobinúria paroxística a frio. Tal AHAI a frio, mediada pela IgG, acomete frequentemente crianças abaixo dos 5 anos de idade após infecção das vias respiratórias superiores. A doença é caracterizada por hemólise intravascular, apresentando palidez, icterícia e hemoglobinúria, febre e dor abdominal. O sangue periférico apresenta policromasia, esferocitose e aglutinação de hemácias (Figuras 3.84 e 3.85).

ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE INDUZIDA POR FÁRMACOS

Vários fármacos podem induzir a formação de anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários e, consequentemente, causar AHAI. Os principais etiopatogênicos são:

1. **Adsorção do fármaco (penicilina)**: funciona como hapteno e liga-se fortemente às proteínas da membrana eritrocitária. Isso resulta na síntese de anticorpos dirigidos contra o fármaco ligado às hemácias, o que leva a um quadro de hemólise extravascular de instalação insidiosa e raramente grave.
2. **Adsorção de imunocomplexos**: os anticorpos reagem com o fármaco (quinidina, fenacetina, cefalosporina de terceira

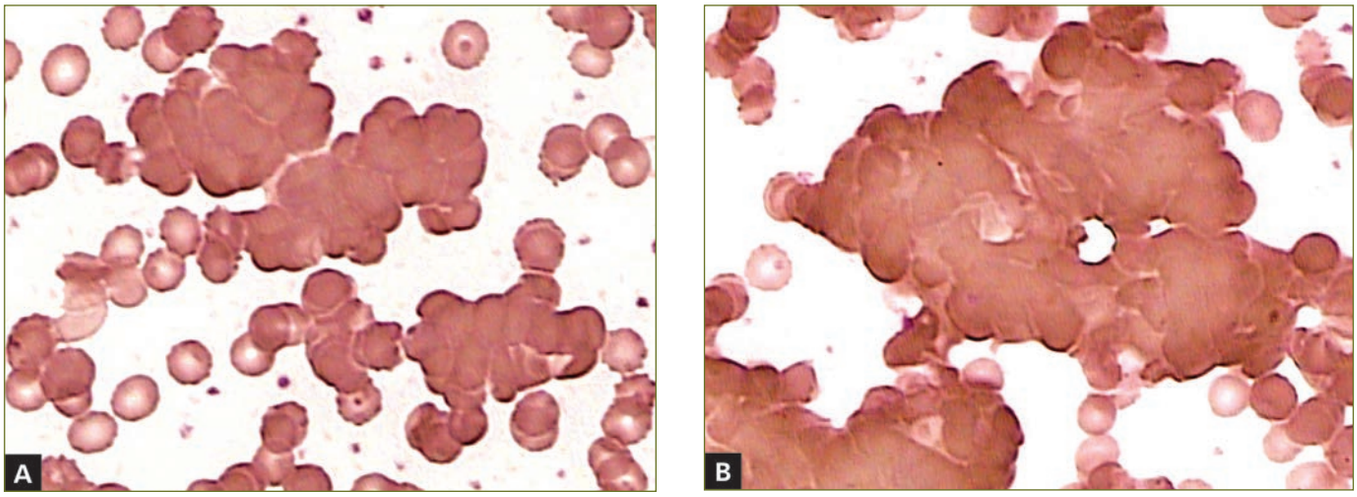


Figura 3.84 (**A** e **B**) Anemia hemolítica autoimune por anticorpo frio: aglutinação de hemácias *in vitro*, na presença de anticorpo frio (2.000×)

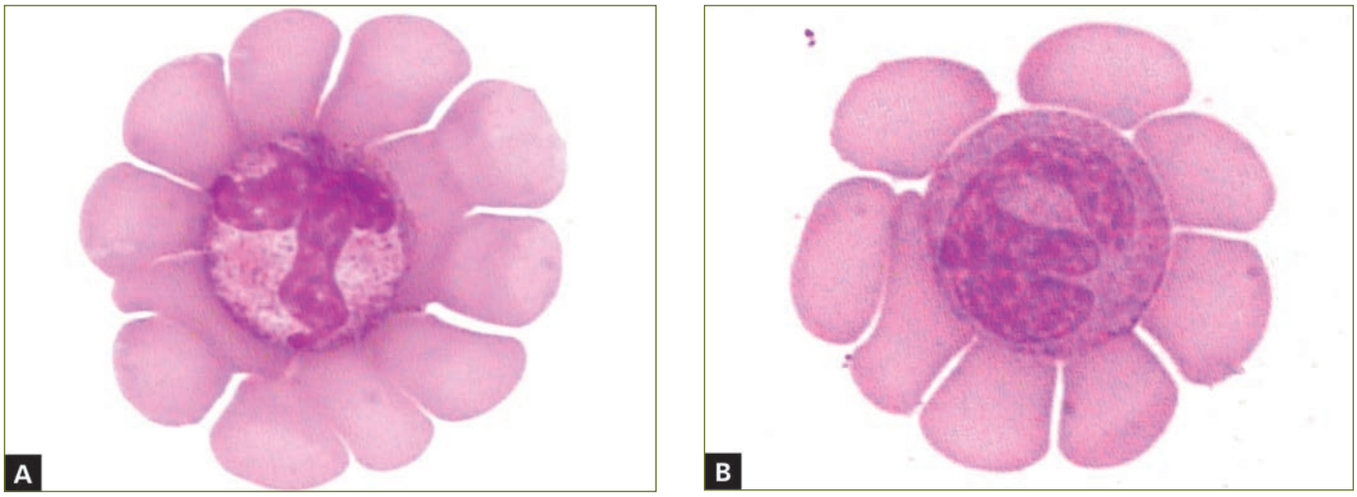


Figura 3.85 (**A** e **B**) Anemia hemolítica autoimune por anticorpo frio: rosetas (2.000×)

geração), para formar imunocomplexos que são adsorvidos pelos receptores específicos das hemácias, e podem ativar o sistema complemento e desencadear hemólise intravascular.

3. **Indução de autoimunidade**: fármacos (alfametildopa, procainamida) podem induzir à formação de autoanticorpos (principalmente IgG) que reagem com antígenos eritrocitários, em geral, relacionados com o grupo Rh.

Na AHAI induzida por fármaco, o teste de Coombs direto é geralmente positivo, podendo ou não ser acompanhado de anemia normocítica e normocrômica, reticulocitose, esferocitose e eventuais corpúsculos de Howell-Jolly. Se houver hemólise intravascular, podem ocorrer, ainda, hemoglobinemia e hemoglobinúria (Figura 3.86). As bilirrubinas e a DHL também podem estar aumentadas.

Quando o fármaco corresponde ao principal componente do antígeno, na maioria das vezes, a suspensão do medicamento é suficiente para assegurar o término da hemólise.

ANEMIA HEMOLÍTICA PERINATAL

A anemia hemolítica perinatal (DHPN), também conhecida como doença hemolítica do recém-nascido e eritroblastose fetal, consiste na incompatibilidade sanguínea entre mãe e feto. Ou seja, ela ocorre quando a mãe Rh negativo (antígeno D eritrocitário ausente) é exposta a hemácias de Rh positivo (com antígeno D presente) provenientes do feto, antes ou durante o parto.

Após a primeira exposição ao antígeno D, tem início a produção de anticorpos anti-D, nas gestações seguintes com feto de Rh positivo. Os aloanticorpos anti-D maternos, por serem da classe IgG, atravessam a barreira placentária e ligam-se às hemácias do feto, iniciando o processo hemolítico pelo sistema reticuloendotelial. A mãe também pode ser sensibilizada por abortamento anterior, amniocentese ou outro traumatismo placentar. Se o pai for heterozigoto para o antígeno D (D/d), há 50% de probabilidade de o feto ser Rh-D positivo.

No sangue periférico do recém-nascido, observam-se anemia com reticulocitose, policromasia e aumento do número de

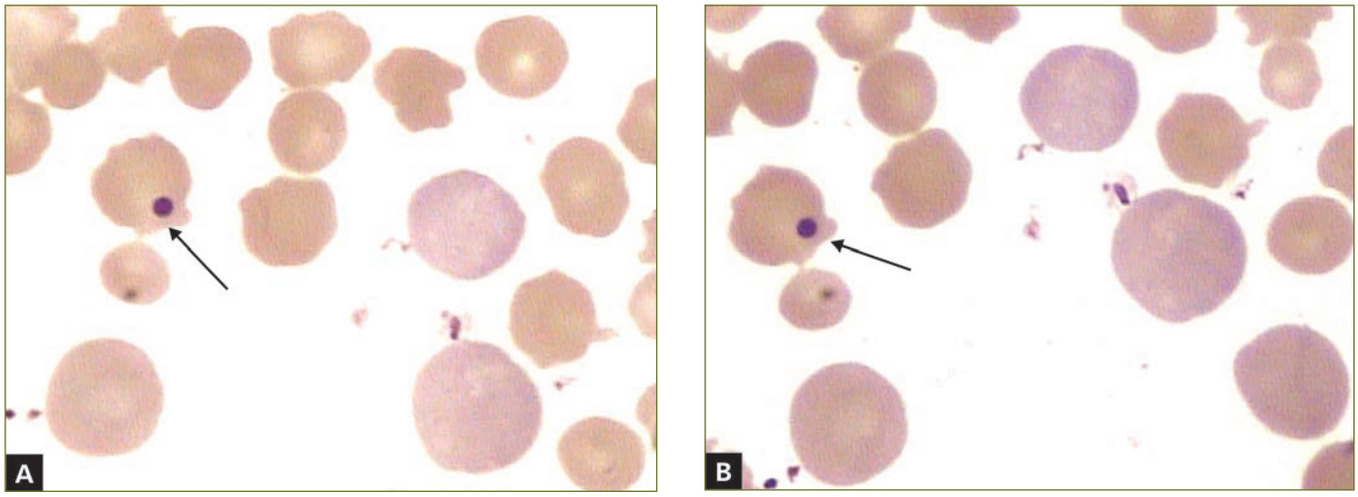


Figura 3.86 (**A** e **B**) Anemia hemolítica autoimune induzida por fármaco: policromasia, esferócitos e corpúsculos de Howell-Jolly (*setas*) (2.000×)

eritroblastos circulantes – por isso, a denominação eritroblastose fetal (Figura 3.87).

O Coombs direto é positivo no recém-nascido, o que indica a ligação dos anticorpos maternos às hemácias do bebê. Na mãe, o Coombs indireto é positivo.

Nos exames bioquímicos, a bilirrubina indireta está aumentada, assim como a DHL.

Em geral, o primeiro filho não é acometido pela aloimunização materna e apresenta quadro leve de DHPN. O diagnóstico da DHPN pode ser realizado tanto no período gestacional (pré-natal) quanto após o nascimento.

Testes sorológicos e clínicos, quando realizados durante a gravidez, podem determinar o nível de anticorpo na circulação materna, o potencial do anticorpo como causador da doença hemolítica e a gravidade da destruição das hemácias. Novas terapias têm sido desenvolvidas para o tratamento do recém-nascido com DHPN, como fototerapias de alta intensidade e a imunoglobulina humana inespecífica, levando à diminuição no uso de exsanguineotransfusão. No entanto, esta ainda é uma técnica usada em casos graves de hiperbilirrubinemia.

ANEMIAS POR DISFUNÇÃO MEDULAR

A insuficiência medular pode ocorrer devido à hipoplasia ou à aplasia da medula óssea, em que o tecido hematopoético apresenta-se diminuído ou ausente, promovendo uma infiltração de vacúolos de gordura. A produção celular da medula óssea também está prejudicada quando ocorre infiltração por células neoplásicas ou anormais e, por fim, remove o tecido hematopoético normal. Outro grupo de aplasias medulares ocorre devido à formação de um quadro de hematopoese ineficaz, em que a medula óssea reduz a produção de células maduras e funcionais pela incapacidade de manter as etapas normais de maturação e diferenciação celular.

APLASIA PRIMÁRIA

A aplasia primária é também denominada aplasia primária idiopática ou, em muitos artigos científicos, conhecida como anemia aplástica. Nesta aplasia, não é possível identificar uma causa subjacente da doença, tornando-a idiopática. Metade

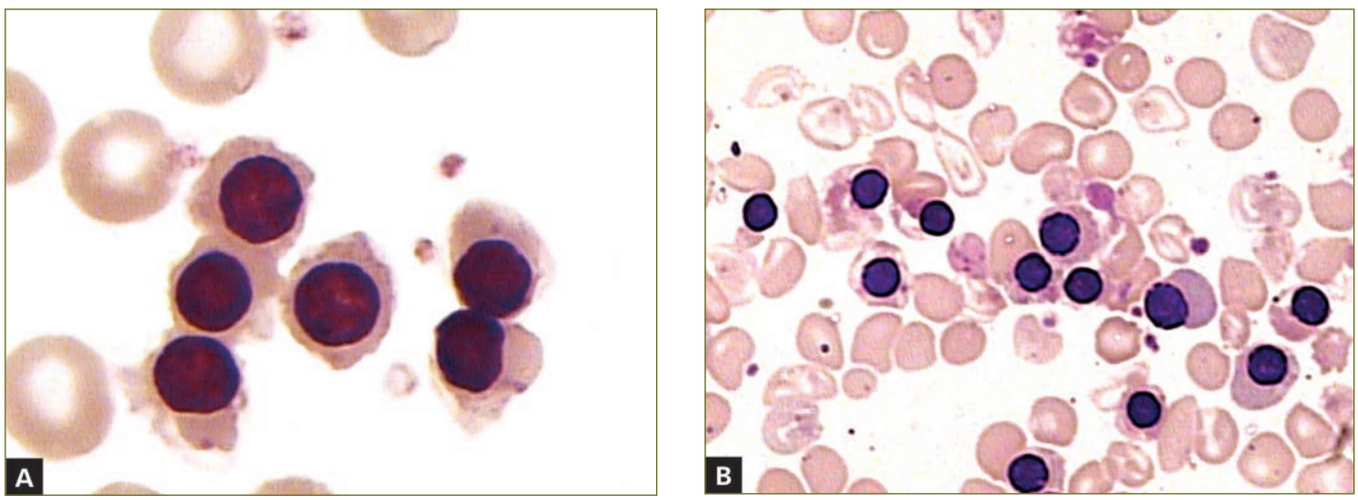


Figura 3.87 (**A** e **B**) Anemia hemolítica perinatal: eritroblastos (2.000×)

dos casos de aplasias medulares adquiridas é atribuída à aplasia primária.

Na medula óssea, ocorre uma hipoplasia e, no sangue periférico, observa-se uma pancitopenia de grau variado, mas sem alterações morfológicas significativas nas hemácias (Figura 3.88). Geralmente, a anemia é macrocítica e observa-se a reticulocitopenia em quase todos os casos. Na leucopenia, a netropenia é o componente diagnóstico mais importante. A biopsia de medula óssea e o mielograma revelam a hipocelularidade medular. O quadro clínico característico da aplasia medular primária é de fraqueza, cansaço, infecções e sangramentos.

APLASIA SECUNDÁRIA

Geralmente, a aplasia secundária de medula óssea está associada a doenças ou fatores subjacentes, como quimioterapia, radioterapia, certos fármacos (antimaláricos, antireumáticos e cloranfenicol), e infecções virais, como a hepatite C e o HIV. O controle ou a remoção dos fatores subjacentes da aplasia secundária melhoram o quadro hematológico na maioria dos casos.

A análise do esfregaço do sangue periférico nos pacientes com aplasia secundária revela citopenias, em uma ou mais séries, com alguns pecilócitos inespecíficos. A medula óssea apresenta-se hipocelular, na maioria das vezes, com sinais de displasia.

APLASIAS CONGÊNITAS

As aplasias congênitas são enfermidades raras que, na maioria das vezes, são diagnosticadas na infância e na adolescência. Trata-se de síndromes hereditárias que apresentam mortalidade importante. Constituem um grupo heterogêneo que se caracteriza por insuficiência medular associada comumente a uma ou mais anomalias somáticas e com risco elevado para formações neoplásicas. A aplasia congênita mais comum é a anemia de Fanconi, que tem uma herança recessiva ligada ao cromossomo X. A anemia de Fanconi apresenta manifestações hematológicas caracterizadas por anemia macrocítica, neutropenia e plaquetopenia. Nos pacientes com essa anemia, podem ocorrer retardamento mental, anomalias esqueléticas, alteração na pigmentação da pele, alterações urogenitais e maior risco de desenvolver síndromes mielodisplásicas e leucemia mieloide aguda. A anemia de Blackfan-Diamond tem uma herança autossômica dominante, que pode tornar-se sintomática, logo no inicio da vida, com palidez no período neonatal. Em 75% dos casos, a anemia é diagnosticada até 3 meses de idade; em outros, mais tarde, durante a infância. Os aspectos mais característicos são anemia macrocítica, reticulopenia e deficiência ou ausência de fatores eritroides na medula óssea. É comum a primeira manifestação ser a aplasia eritroide pura, mas, com o passar do tempo, surgem alterações citológicas, como neutropenia e plaquetopenia.

ANEMIA MIELOFTÍSICA

A anemia aplásica mieloftísica é causada pela substituição extensa das células medulares por células neoplásicas ou de outras lesões. Esta aplasia de substituição mantém uma relação metastática grande com os tumores de mama, próstata e tireoide. No esfregaço do sangue periférico da anemia mieloftísica, é comum observar um "quadro leucoeritroblástico" com hemácias com alterações morfológicas e imaturas, junto com o aumento do número de leucócitos. Raramente, observam-se no sangue periférico células neoplásicas metastáticas. A biópsia de medula óssea é a melhor conduta diagnóstica para definir a anemia mieloftísica

ANEMIA SIDEROBLÁSTICA

A anemia sideroblástica representa um grupo de distúrbios heterogênicos hematológicos que têm em comum depósitos de ferro nas mitocôndrias dos eritroblastos. Deficiências enzimáticas ou defeitos mitocondriais podem prejudicar a síntese da heme. Consequentemente, ocorre prejuízo na síntese de hemoglobina, causando anemia e hipocromia, e acúmulo de ferro na mitocôndria, o que origina o eritroblasto em anel,

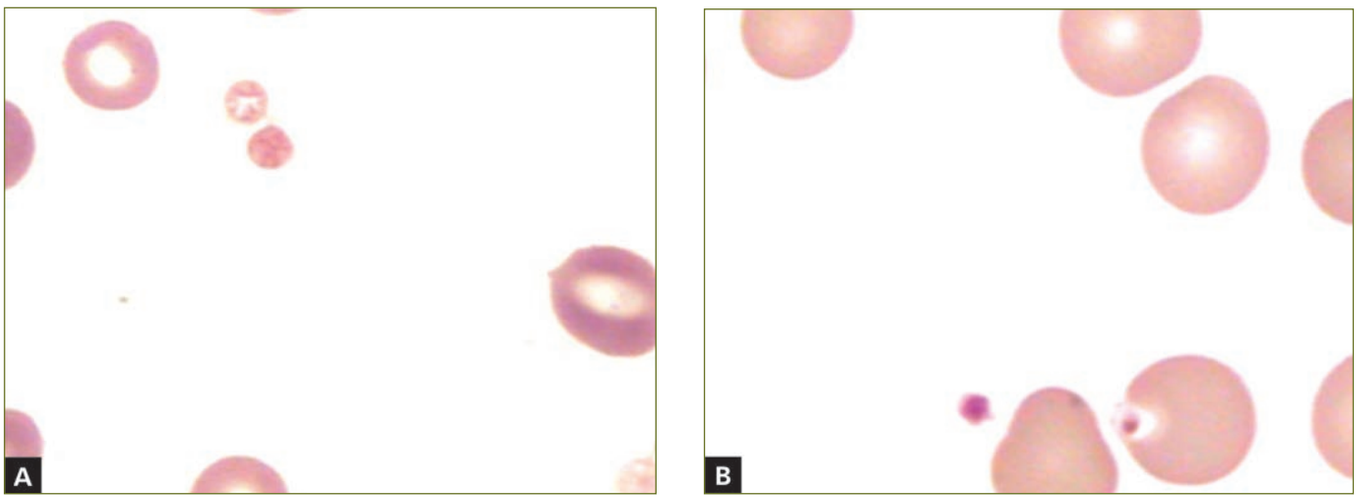


Figura 3.88 (**A** e **B**) Aplasia primária: pancitopenia, sem alterações morfológicas significativas nas hemácias (2.000×)

observado na medula óssea. Com essas alterações, forma-se um quadro de eritropoese ineficaz.

A anemia sideroblástica pode ser hereditária ou adquirida. A forma hereditária pode ser causada por herança ligada ao X, herança autossômica dominante ou síndrome de Pearson. Já a forma adquirida pode ser idiopática pura, associada a mielodisplasia, doenças mieloproliferativas, quimioterapia, alcoolismo, deficiência de cobre e hipotermia.

No esfregaço do sangue periférico dos pacientes portadores de anemia sideroblástica, são comuns anisocitose e hemácias em lágrima. Por um breve período, podem-se observar corpúsculos de Pappenheimer, que são precipitados de ferro nas mitocrôdrias, retidos pelas hemácias (Figura 3.89).

O diagnóstico de anemia sideroblástica só é confirmado por meio de mielograma, quando são encontrados mais de 15% de eritroblastos do tipo sideroblastos em anel.

OUTRAS ALTERAÇÕES DAS HEMÁCIAS

PORFIRIA

As porfirias são um grupo de doenças neurológicas e cutâneas associadas a deficiências hereditárias e adquiridas na via da biossíntese da heme. Podem-se classificar as porfirias em primárias (herdadas) ou secundárias (adquiridas). As porfirias primárias são divididas em formas neurológicas e/ou psiquiátricas e formas cutâneas. Entre outros, os sintomas da forma neurológica são:

- Dores abdominal e torácica.
- Fraqueza.
- Confusão mental.
- Taquicardia.
- Leucocitose.
- Febre.

Nas formas cutâneas, as porfirinas depositadas na pele e expostas à luz solar causam lesões cutâneas. Nas porfirias secundárias ou adquiridas, o defeito metabólico não é congênito, mas decorrentes de uma inibição enzimática secundária à toxina ou a uma substância, como o chumbo.

ERITROCITOSES

Eritrocitose é o aumento proporcional de hemácias no sangue periférico. Deve-se preferir este termo a policitemia. Isso porque, na policitemia *vera*, pode ocorrer aumento do número tanto das hemácias como também de leucócitos e plaquetas (Figura 3.90).

De acordo com sua patogenia, as eritrocitoses são classificadas como relativas, caso sejam causadas por hemoconcentração, ou como absolutas decorrentes de um aumento na produção de hemácias. São exemplos as doenças cardiopulmonares e as neoplasias renais. As eritrocitoses absolutas causadas por aumento da produção de eritropoetina são classificadas como secundárias. Já a causada por uma proliferação eritroide autônoma (sem aumento da eritropoetina) é classificada como primária ou verdadeira (policitemia *vera*).

A policitemia *vera* é uma doença mieloproliferativa das células monoclonais caracterizada por uma produção anormal e acentuada de hemácias, leucócitos e plaquetas. É uma doença rara, com incidência de 2,3/100.000 pessoas por ano. Embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, a idade média dos pacientes é de 60 anos, com leve predomínio do sexo masculino. A sobrevida média dos pacientes sintomáticos sem tratamento é de 6 a 18 meses, enquanto os pacientes com suporte adequado podem viver mais de 10 anos.

Na policitemia *vera*, a elevação acentuada da massa eritrocitária e a hiperviscosidade sanguínea são as manifestações clínicas mais evidentes, com vermelhidão da pele, prurido e esplenomegalia, além de risco de trombose e hemorragias, que ocorrem em até 25% dos casos.

Por definição, a eritrocitose deve ser considerada com hematócrito maior que 51% nos homens e 48% nas mulheres. Os pacientes devem ser avaliados individualmente. A redução do hematócrito por sangria reduz a viscosidade do sangue e, consequentemente, alivia nos sintomas e diminui o risco de trombose.

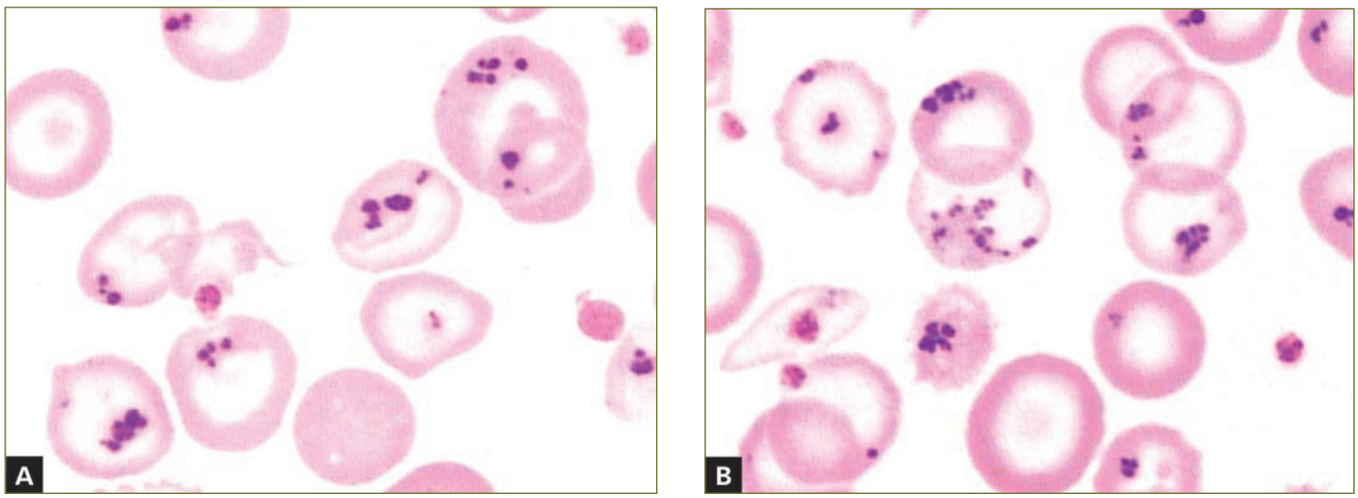


Figura 3.89 (**A** e **B**) Anemia sideroblástica: corpúsculos de Pappenheimer (2.000×)

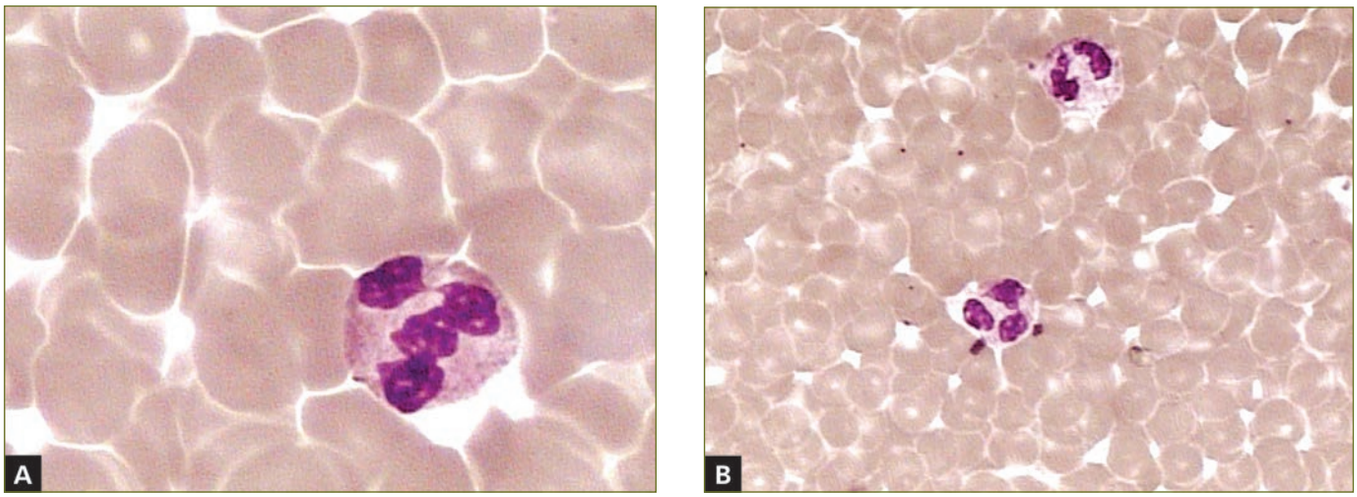


Figura 3.90 (**A** e **B**) Eritrocitose: acentuado aumento no número de hemácias (2.000×)

4

Leucócitos

INTRODUÇÃO

O termo leucócito é de origem grega. *Leuco* significa "branco" e *cito*, "célula". Leucócitos, ou glóbulos brancos, são células nucleadas descritas pela primeira vez entre 1770 e 1777 por William Hewson, um cirurgião e anatomista inglês, considerado o pai da hematologia por vários autores. Estas células oriundas da medula óssea são transportadas pelo corpo através do sangue e estão na linfa, nos órgãos linfoides e em vários tecidos conjuntivos.

Os leucócitos são classificados em polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monomorfonucleares (linfócitos e monócitos) (Figura 4.1). O termo granulócitos também é utilizado para indicar polimorfonucleares imaturos e maduros do sangue periférico. Do mesmo modo, os agranulócitos têm grânulos: no caso dos linfócitos, podem ser proeminentes, mas são também escassos. Nos monócitos, os grânulos geralmente não são perceptíveis.

Os leucócitos são células que fazem parte do sistema imunológico do organismo e têm como principais funções o combate e a eliminação de microrganismos e estruturas químicas estranhas ao organismo – sejam eles patogênicos ou não. Deslocam-se através dos espaços dos tecidos por movimentos ameboides (diapedese) e, como respondem a estímulos químicos liberados pelas células danificadas ou por outros leucócitos, são capazes de localizar tecidos danificados ou infectados por microrganismos.

Os leucócitos apresentam-se em vários tamanhos, formas e número e, na maioria das vezes, agem como se fossem organismos vivos e independentes, com capacidade de se mover e fagocitar microrganismos e resíduos por conta própria. Em média, existem de 4.000 a 11.000 leucócitos/mm^3 no sangue periférico.

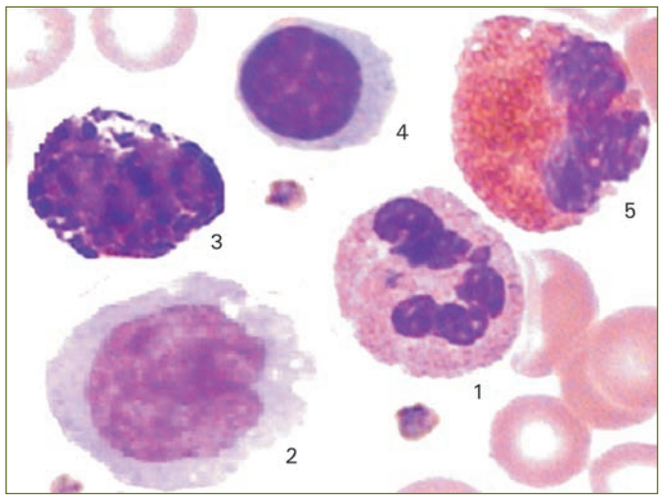


Figura 4.1 Sangue periférico. Neutrófilo (**1**); monócito (**2**); basófilo (**3**); linfócito (**4**); e eosinófilo (**5**) (2.000×)

NEUTRÓFILOS

No adulto em condições normais, o neutrófilo é o leucócito mais abundante, chegando a 70% de incidência, e mede de 12 a 15μm de diâmetro. Tem uma vida média de 6 a 9h no sangue periférico e 5 dias nos tecidos. O núcleo apresenta-se com cromatina em grumos em forma de bastão ou dividido de 2 a 5 lóbulos ligados por filamentos de heterocromatina. O citoplasma dos neutrófilos apresenta reação neutra em corantes hematológicos, além de numerosos grânulos pequenos. Estes últimos são constituídos por enzimas oxidativas que promovem a ingestão e a destruição de microrganismos, além de enzimas hidrolíticas – as quais digerem as partículas fagocitadas.

Os neutrófilos têm propriedades de defesa contra microrganismos, principalmente bactérias e fungos. Por meio de motilidade, quimiotaxia e fagocitose, a ação bactericida dos neutrófilos é bastante eficaz. Os agentes quimiotáticos para neutrófilos são as quimiocinas ou citocinas. Estímulos quimiotáticos agem sobre receptores de membrana, desencadeando os eventos de quimiotaxia. O neutrófilo produz espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 e O_2^-) que atuam em conjunto com as enzimas contidas nos grânulos na destruição dos microrganismos. As granulações dos neutrófilos podem ser primárias, secundárias e terciárias. As granulações primárias (azurófilas) são compostas pelas enzimas (hidrolases ácidas). Elas degradam bactérias e restos celulares em pH ácido, catalisam a formação de espécies reativas de oxigênio e proteínas catiônicas, aumentam a permeabilidade vascular e destroem microrganismos. As granulações tóxicas secundárias são formadas pela enzima lisozima, que destrói o peptideoglicano da parede celular bacteriana, a lactoferrina. Esta última captura o ferro, importante para o metabolismo das bactérias (bacteriostático). A granulação terciária é composta pela enzima gelatinase, que atravessa a membrana celular e hidrolisa a gelatina. As Figuras 4.2 a 4.13 mostram a maturação do neutrófilo e as alterações nucleares e citoplasmáticas desta célula.

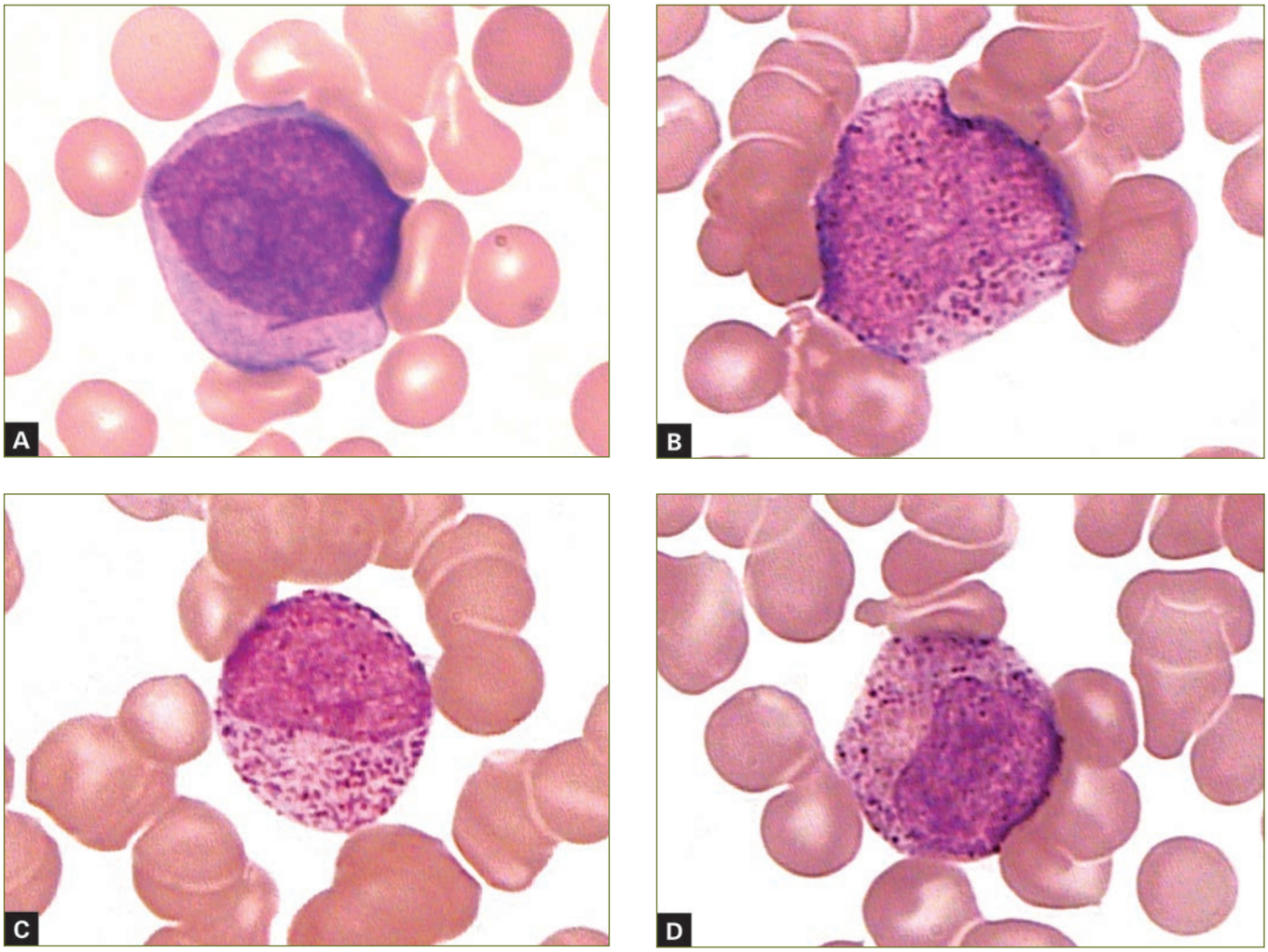


Figura 4.2 (**A** a **L**) Maturação do neutrófilo. Blasto mieloide (**A**); promielócito (**B**); mielócito (**C**); metamielócito (**D**); fase intermediária entre metamielócito e bastão (**E**); (2.000×) (*continua*)

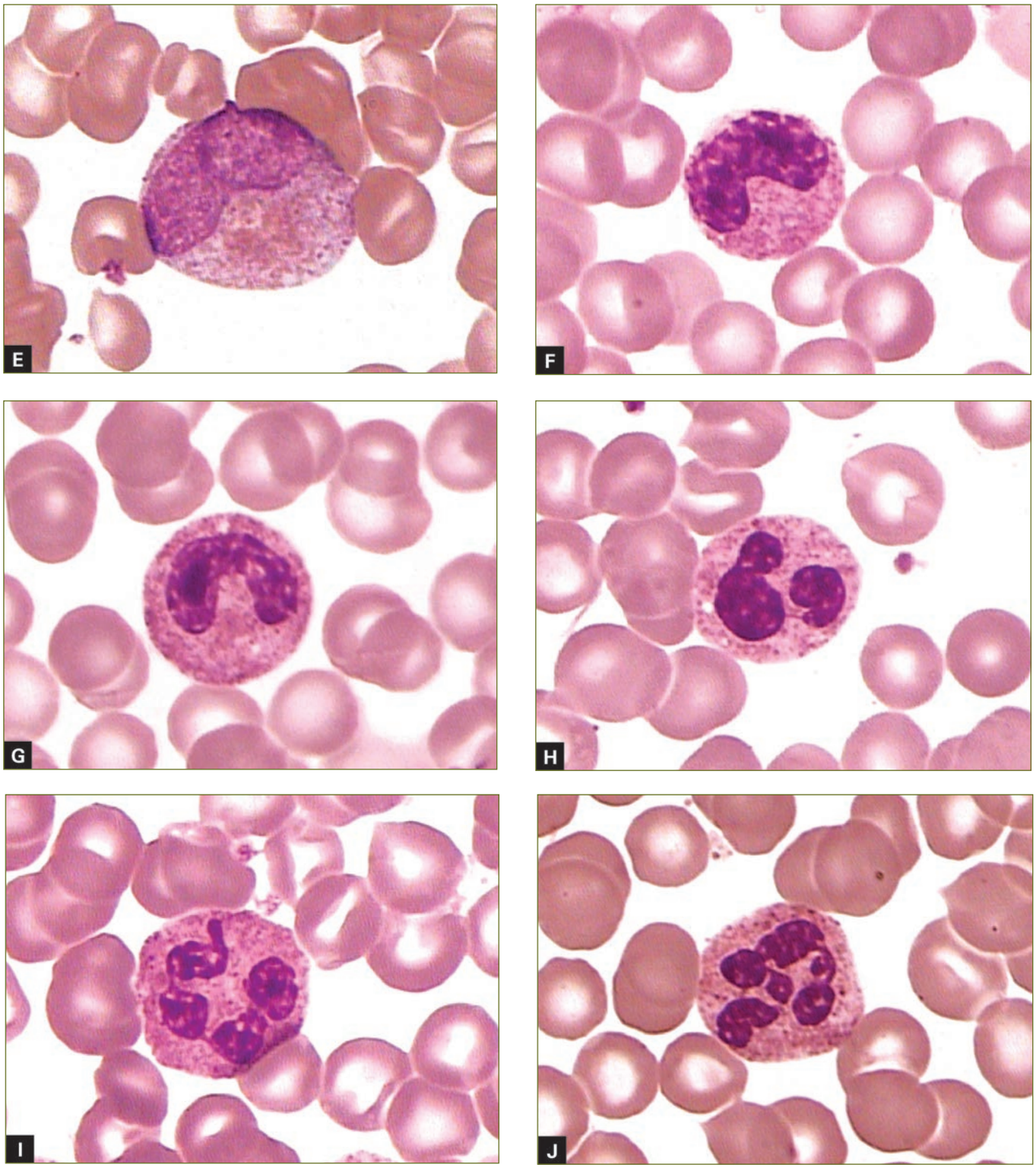


Figura 4.2 (**A** a **L**) (*continuação*) Maturação do neutrófilo. Fase intermediária entre metamielócito e bastão (**E**); bastão (**F**); bastão delgado (**G**); neutrófilo segmentado (**H**); neutrófilo com 4 lobos (**I**); neutrófilo com 5 lobos (**J**); (2.000×) (*continua*)

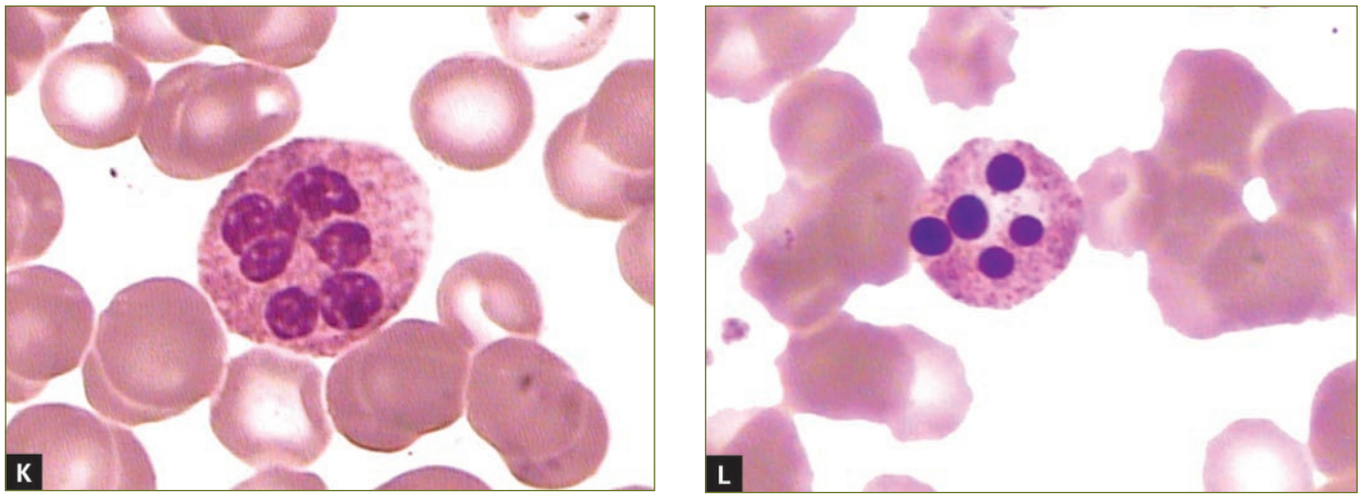


Figura 4.2 (**A** a **L**) (*continuação*) Maturação do neutrófilo. Neutrófilo hipersegmentado, com 6 lobos (**K**); neutrófilo apoptótico (**L**) (2.000×)

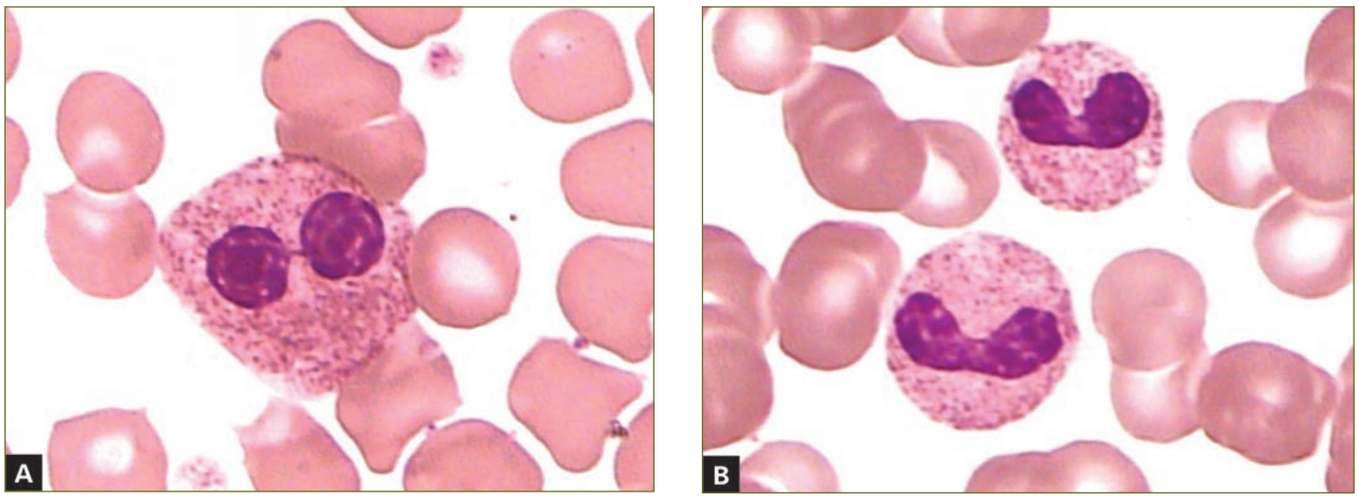


Figura 4.3 (**A** e **B**) Neutrófilos bissegmentados ou em bastão com cromatina condensada, observados na anomalia de Pelger-Huët (2.000×)

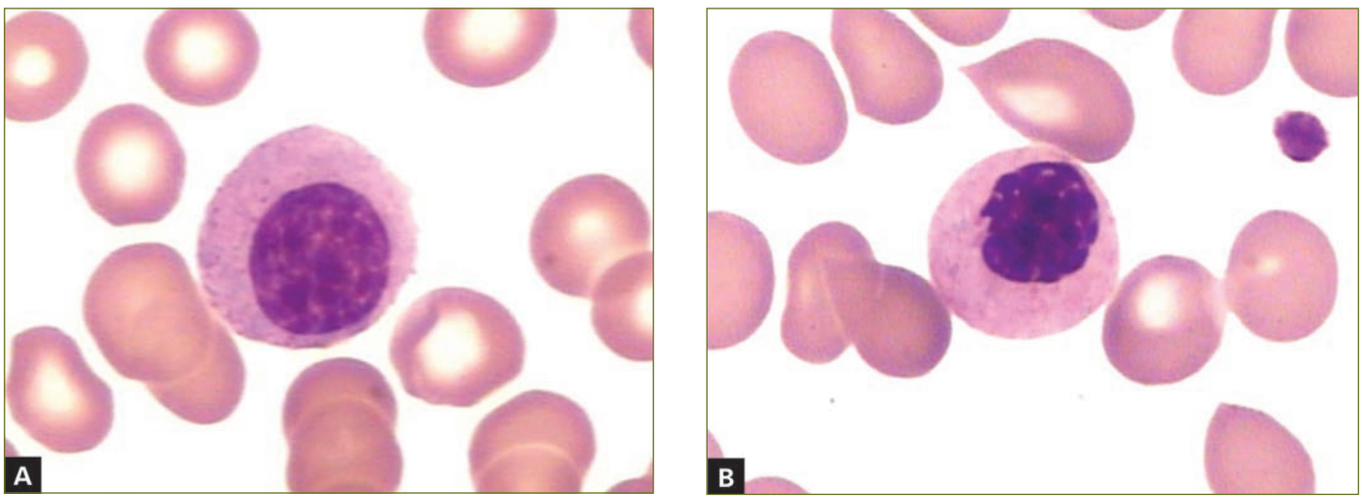


Figura 4.4 (**A** e **B**) Neutrófilos com núcleo arredondado com cromatina densa, observados na pseudoanomalia de Pelger-Huët (2.000×)

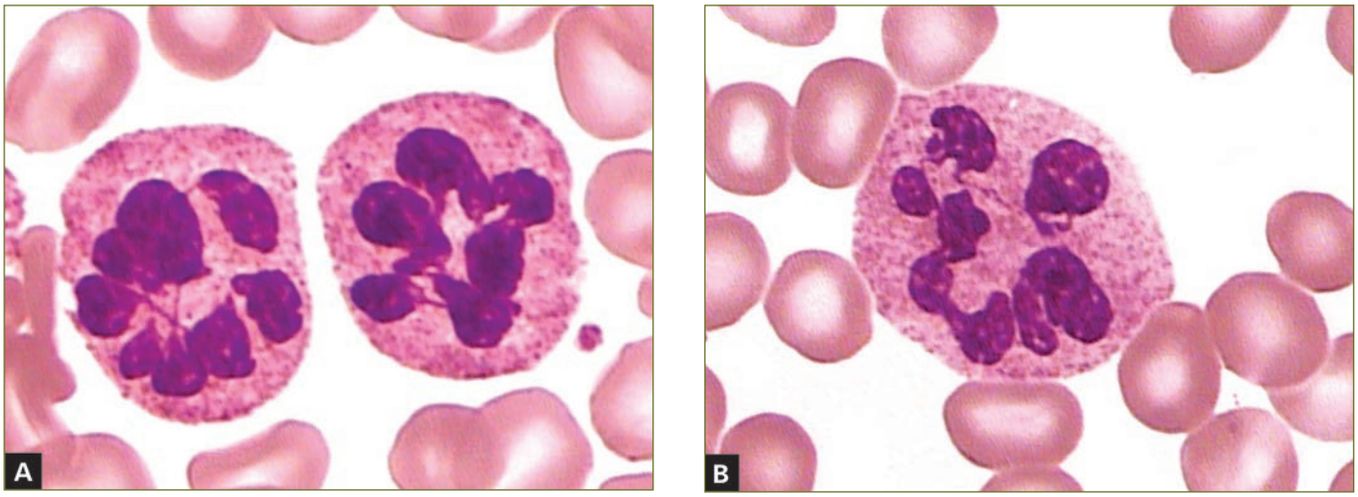


Figura 4.5 (**A** e **B**) Neutrófilos hipersegmentados, com mais de seis lobos (2.000×)

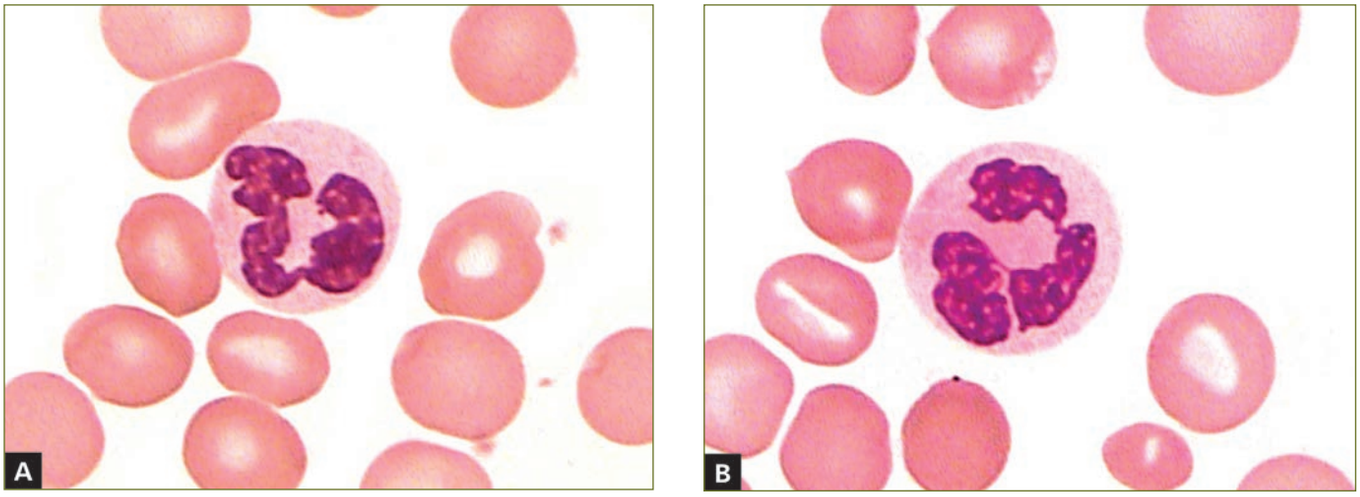


Figura 4.6 (**A** e **B**) Neutrófilos hipogranúlicos, observados na síndrome mielodisplásica (2.000×)

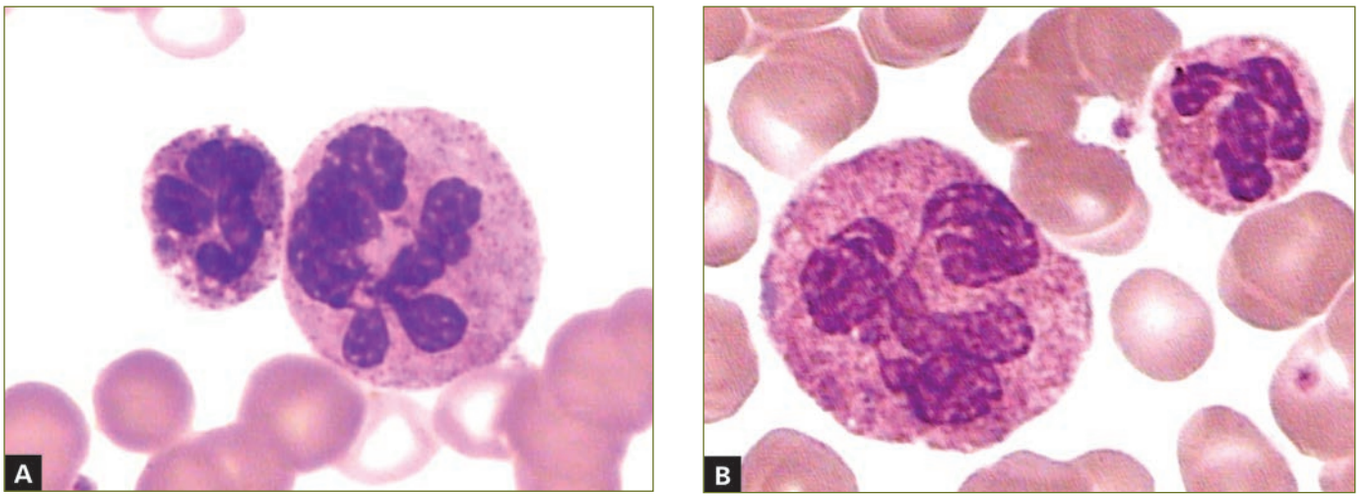


Figura 4.7 (**A** e **B**) Neutrófilos com gigantismo, observados na síndrome mielodisplásica (2.000×)

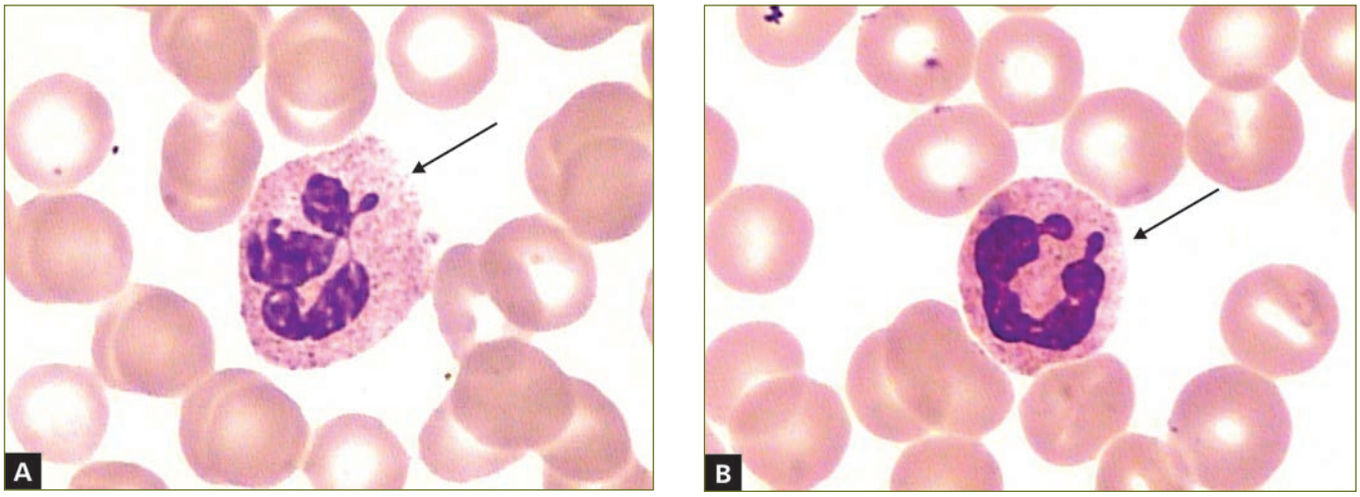


Figura 4.8 (**A** e **B**) Neutrófilo com corpúsculo de Barr. Uma baqueta (*seta*) corresponde a mulheres normais (**A**); duas baquetas correspondem a mulheres 46XXX, com triploidia do cromossomo X (*seta*) (**B**) (2.000×)

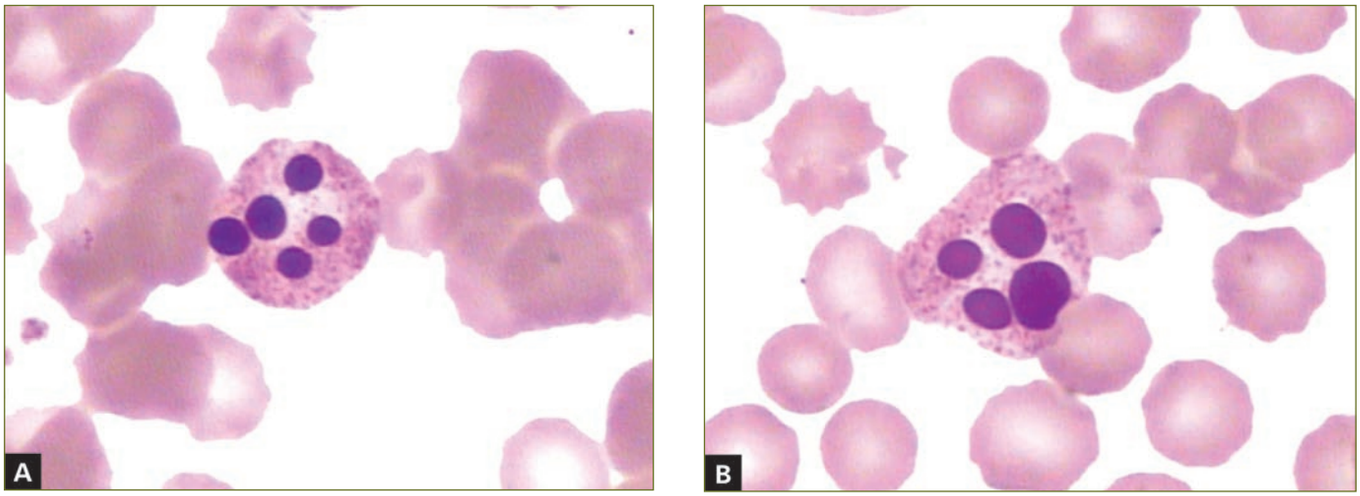


Figura 4.9 (**A** e **B**) Neutrófilo apoptótico, com cromatina picnótica (morte celular) (2.000×)

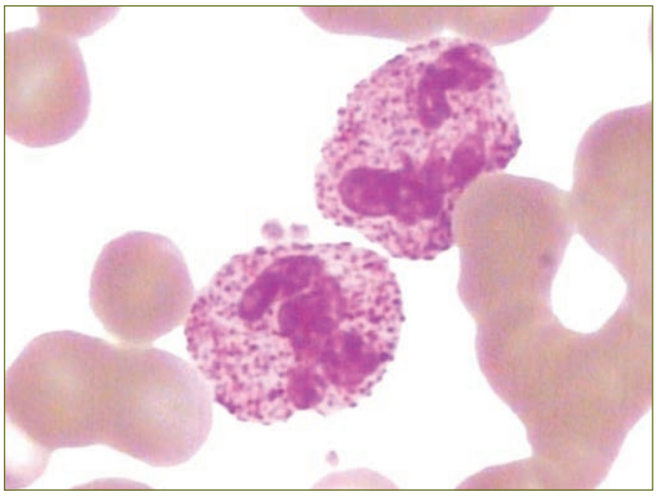


Figura 4.10 Neutrófilo com granulações tóxicas (2.000×)

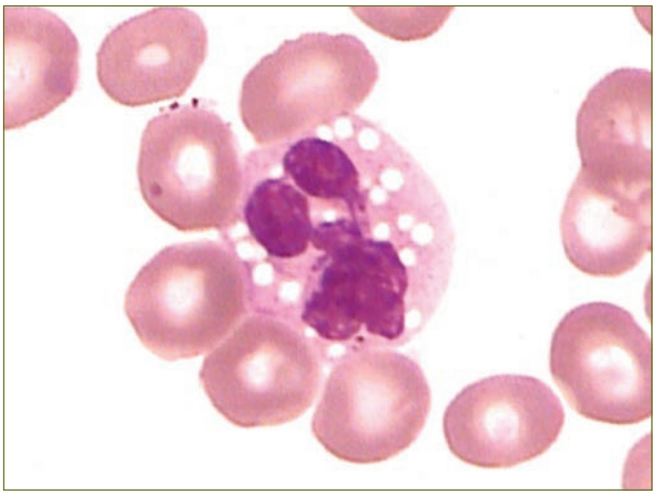


Figura 4.11 Neutrófilo com vacuolização citoplasmática (2.000×)

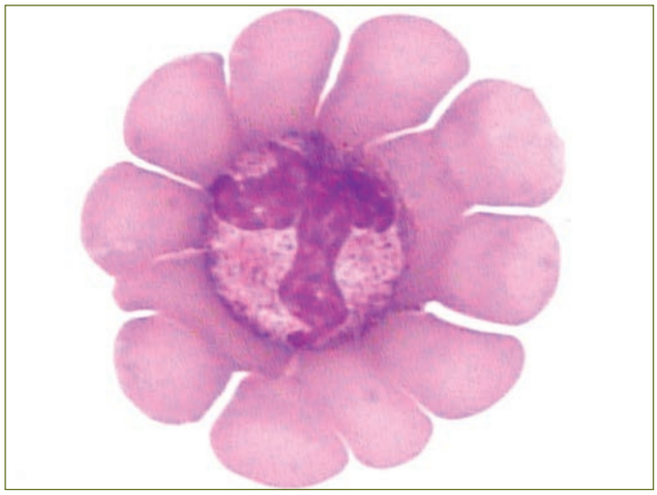


Figura 4.12 Roseta. Neutrófilo com roseta de hemácias, observado nas anemias hemolíticas autoimunes (2.000×)

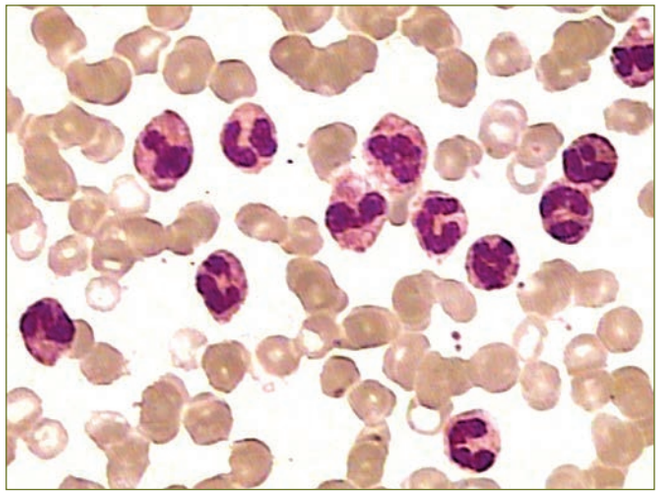


Figura 4.13 Neutrofilia: número aumentado de neutrófilos (2.000×)

EOSINÓFILOS

Os eosinófilos apresentam diâmetro um pouco maior que os neutrófilos, medindo de 12 a 17μm, e têm uma vida média de 4 a 8h no sangue periférico e até 12 dias em condições normais, em tecidos, pele, glândulas e útero. No entanto, podem apresentar um maior tempo de sobrevida no tecido brônquico, retardando a apoptose para até 14 dias. Após esse tempo, são eliminados pelos macrófagos. Apresentam morfologia nuclear geralmente bilobulada, com granulações alaranjadas grosseiras no citoplasma (Figuras 4.14 a 4.20).

A função dos eosinófilos é modular as respostas inflamatórias nas reações alérgicas e produzir interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento, leucotrienos, histaminases e aril sulfatase B. São atraídos para áreas inflamatórias por meio de mediadores químicos liberados por vários tipos celulares. A ação defensiva do eosinófilo é feita pela liberação do conteúdo dos grânulos para o meio extracelular, bem como a liberação de mediadores químicos.

Os eosinófilos conjugam-se apenas com os parasitos recobertos com anticorpos. Assim, degranulam e liberam seu conteúdo sobre os parasitos, levando à ação da proteína catiônica eosinofílica e provocando a destruição desses organismos. Os eosinófilos também podem estimular a liberação de histamina armazenada nos basófilos. Geralmente, a eosinofilia aparece em processos alérgicos (asma e eczemas) e doenças parasitárias. A eosinopenia costuma ocorrer em processos infecciosos agudos e na utilização de glicocorticoides. Os valores de referência dos eosinófilos ficam entre 1% e 7%.

BASÓFILOS

Os basófilos são os leucócitos que apresentam no sangue periférico os valores de referência mais baixos – cerca de 0% a 2%. Têm tamanho de, aproximadamente, 10 a 15μm (Figuras 4.21 a 4.23). Geralmente, o núcleo em condições normais não apresenta mais de dois lobos e não é completamente observado, sendo encoberto por grosseiras granulações densas e escuras, presentes no citoplasma, compostas por mucopolissacarídeos ácidos, histamina, heparina, serotonina e peroxidase.

Os basófilos estão envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata, participando de processos alérgicos produzindo histamina e heparina. Tais células têm receptores para imunogobulinas E. Os basófilos não são considerados os precursores dos mastócitos, pois são células com origens diferentes. O número de basófilo está aumentado na colite ulcerativa, na sinusite crônica, na nefrose, na anemia hemolítica, na doença de Hodgkin, na pós-esplenectomia, na leucemia mieloide crônica, na mielofibrose e na policitemia *vera*. Os basófilos desaparecem em processos infecciosos agudos, gestação, períodos de estresse e síndrome de Cushing.

LINFÓCITOS

Os linfócitos são classificados em três tipos: linfócitos B, linfócitos T e linfócitos NK (exterminadores naturais – *natural killers*). A porcentagem no sangue periférico de linfócitos B é de 5% a 15%; linfócitos T, de 75% a 85%; e linfócitos NK, de 5% a 10%. Estes últimos têm como principal função a destruição das células infectadas por vírus, induzindo-as a sofrer apoptose. Os linfócitos apresentam um tamanho médio de 10 a 12μm. O linfócito pequeno mede entre 7 a 8μm; o grande, 9 a 10μm; e o NK, 10 a 16μm. O tempo médio de vida dos linfócitos varia de semanas, meses a anos.

A característica principal do linfócito B é a síntese de imunoglobulinas (resposta humoral imunitária). O plasmócito é o estágio final na diferenciação do linfócito B, sendo a única célula a secretar ativamente as imunoglobulinas. A nomenclatura do linfócito B deve-se a um divertículo da cavidade cloacal das aves, a bursa, estrutura inexistente nos mamíferos. Os tecidos

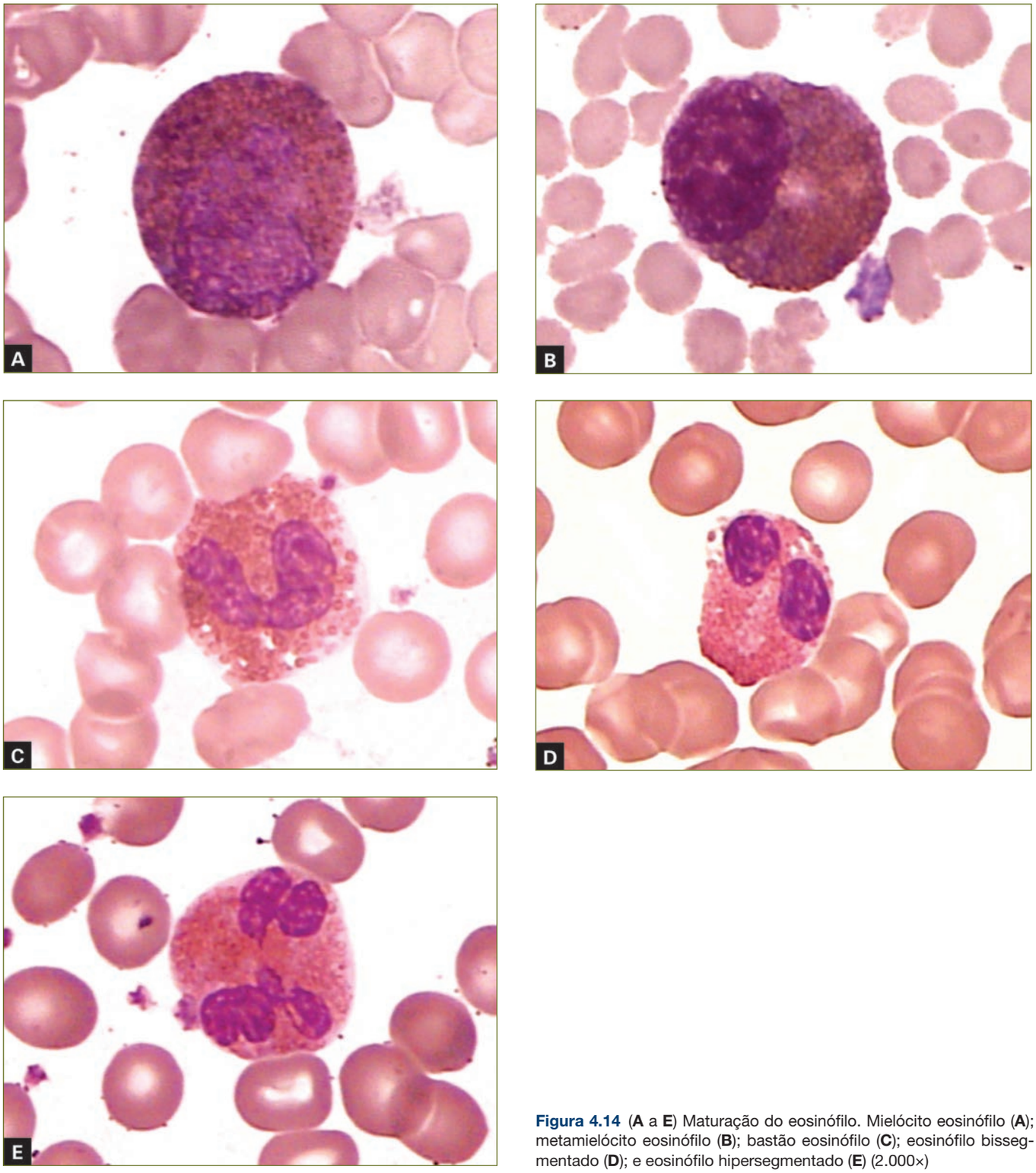


Figura 4.14 (**A** a **E**) Maturação do eosinófilo. Mielócito eosinófilo (**A**); metamielócito eosinófilo (**B**); bastão eosinófilo (**C**); eosinófilo bissegmentado (**D**); e eosinófilo hipersegmentado (**E**) (2.000×)

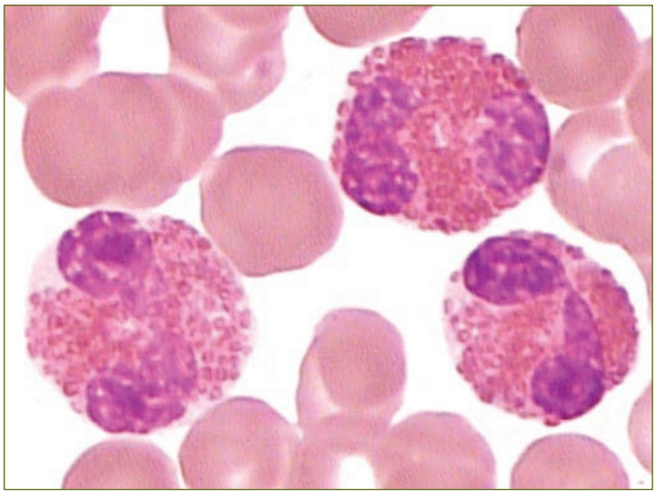


Figura 4.15 Eosinofilia: observada em processos alérgicos e parasitoses (2.000×)

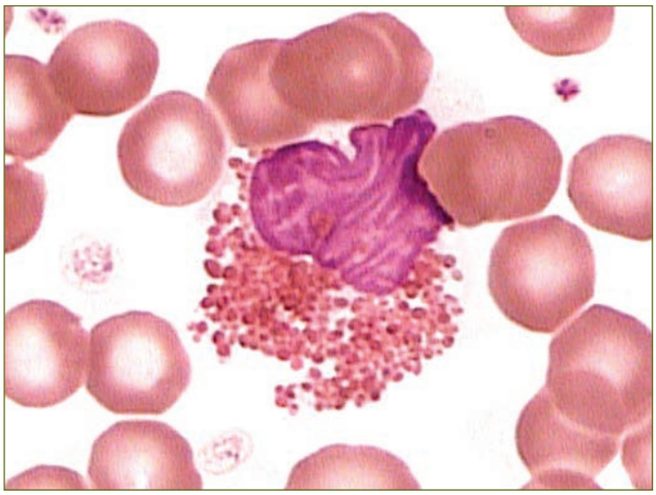


Figura 4.16 Eosinófilo estourado: fragilidade celular (2.000×)

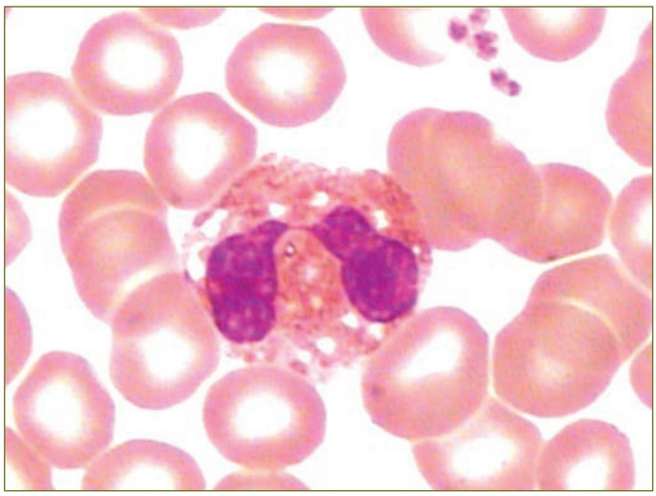


Figura 4.17 Eosinófilo vacuolizado (2.000×)

linfoides associados à bursa podem ser encontrados no apêndice, nas amígdalas, nas paredes do intestino, no baço e em outros órgãos.

Os linfócitos T também têm origem na medula óssea, porém, ainda em estágio precoce de desenvolvimento, migram para o timo, onde ocorre a maturação celular, especialmente o rearranjo dos genes dos seus receptores (TCR) – "expressão de receptores de membrana" –, em que é feita a imunidade celular. Após saírem do timo, os linfócitos T apresentam-se em dois tipos: linfócito T auxiliar (*helper*) CD4; e linfócito T "citotóxico/supressor" CD8.

Na educação tímica, várias moléculas de superfícies celulares são ativadas e desativadas de forma altamente regulada. Com base em suas reatividades a painéis de anticorpos monoclonais, foi criada a nomenclatura *cluster diferenciation* (CD), que significa "conjunto de diferenciação". Hoje, centenas de tipos de "CD" são conhecidos.

Os linfócitos T não reconhecem antígenos solúveis (como as imunoglobulinas), pois seus receptores reconhecem apenas peptídios antigênicos apresentados no complexo de molécula do complexo maior da histocompatibilidade (MHC) das classes I e II. O linfócito T auxiliar CD4 pode induzir a secreção de linfocinas que estimulam a proliferação de linfócitos B, o que ocorre logo após o linfócito T auxiliar ser infectado pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Isso leva à eliminação deste subtipo de linfócito. Este quadro de ativação de linfócito B e depleção de linfócito T é um campo ideal para a instalação de uma neoplasia maligna que, no caso do HIV, a associação patogênica faz desenvolver o linfoma de Burkitt.

No sangue periférico, as células linfoides são difíceis de ser identificadas. Isso se deve a vários fatores de alteração e respostas celulares, além da variabilidade nas etapas de maturação que as células se apresentam (Figuras 4.24 a 4.53).

MONÓCITOS

Os monócitos apresentam diâmetro entre 15 a 18µm e são as maiores células no sangue periférico. O núcleo dos monócitos é bastante irregular e pode ser observado na forma lobulada, riniforme ou em "U". A cromatina exibe aspecto frouxo e reticular, na maioria das vezes. O citoplasma dos monócitos normais tem coloração azul-acinzentada, com pequenas e poucas granulações azurófilas, contendo a enzima esterase (Figuras 4.54 a 4.59).

As principais funções dos monócitos são fagocitose e integração da imunidade celular e humoral. Eles têm origem na medula óssea como todos os leucócitos, mas permanecem no sangue periférico apenas de 8 a 18h, saindo dos vasos sanguíneos e diferenciando-se em macrófagos, que podem receber outros nomes, dependendo de sua atividade ou localização, como: célula de Kupffer, o macrófago do fígado; célula gigante de Langerhans, um macrófago formado pela fusão de células epitelioides, presente nas doenças granulomatosas; histiócito, que é o macrófago do tecido conjuntivo; e osteoclasto, o macrófago das trabéculas do tecido ósseo; entre outros.

Estas células apresentam grande mobilidade e poder de fagocitose. Os macrófagos contêm em seu citoplasma grande

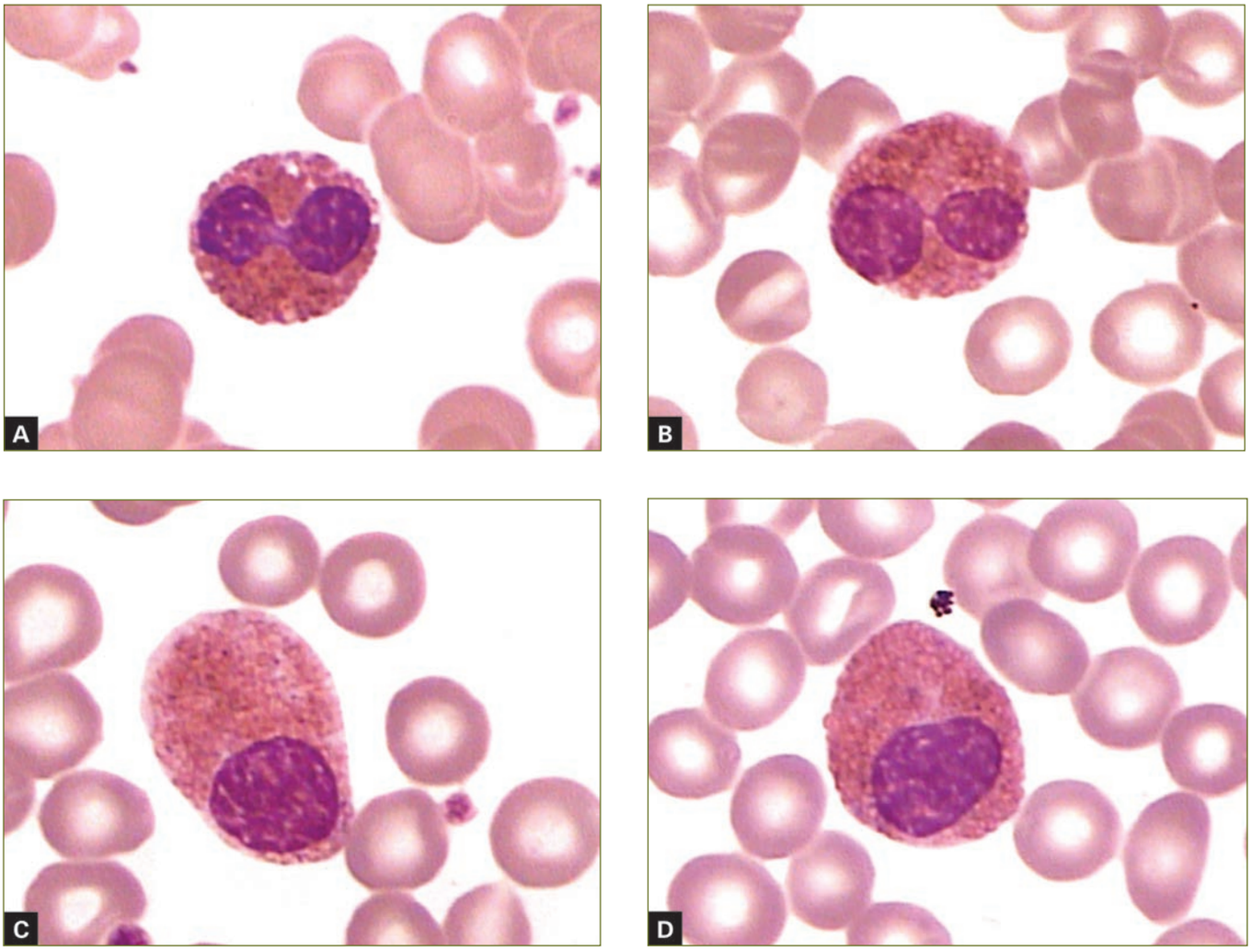


Figura 4.18 (**A** a **D**) Neutrófilos com anomalia de Pelger-Huët, formas binucleadas (**A** e **B**) e formas com núcleos redondos (**C** e **D**) (2.000×)

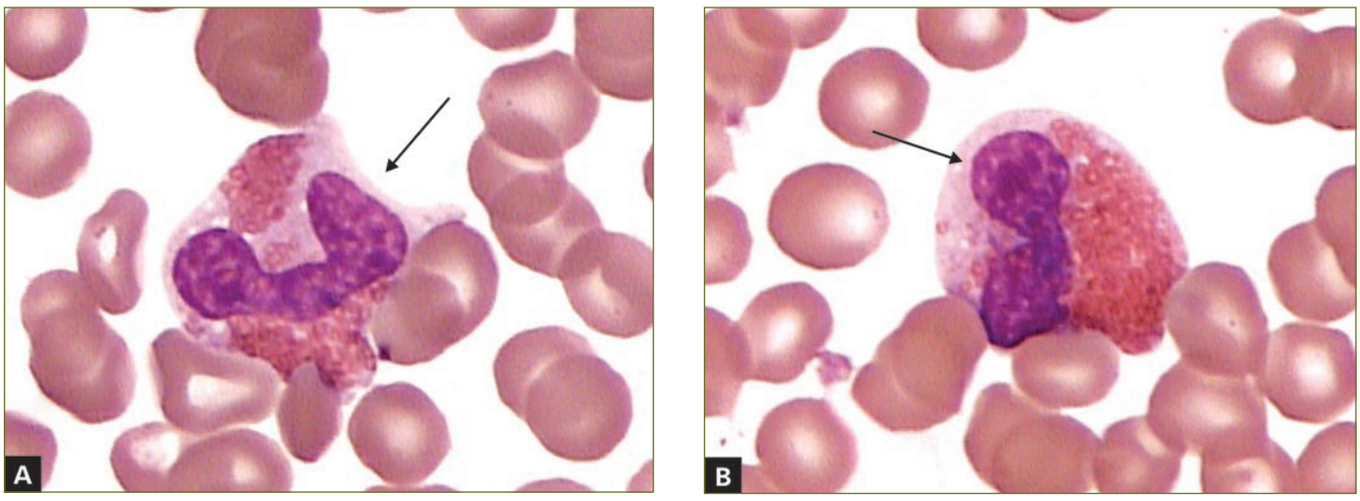


Figura 4.19 (**A** e **B**) Eosinófilos com alteração nos grânulos (*setas*): observados nas displasias e síndrome eosinofílicas (2.000×)

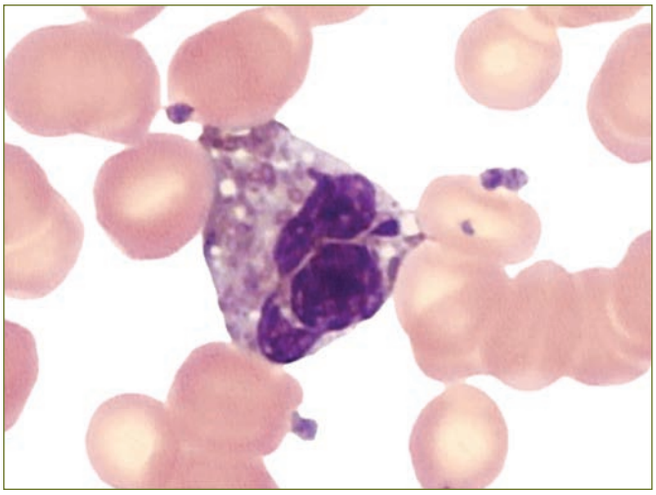


Figura 4.20 Eosinófilo com alteração nos grânulos observado na gangliosidose GM-1 (2.000×)

quantidade de ferritina em depósito. A ferritina tem sido utilizada como um marcador de doenças oncológicas, pois nelas ocorre um aumento evidente da destruição dos macrófagos, levando a uma liberação intensa de ferritina degranulada por estas células.

A monocitose está presente nas infecções crônicas, como a tuberculose; na síndrome mielodisplásica; e em processos inflamatórios, como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso. Além disso, é um valioso marcador de bom prognóstico na recuperação das infecções agudas. Observa-se a monocitopenia nas doenças neoplásicas e em pacientes em tratamentio de quimioterapia, e sua total ausência é notada na tricoleucemia. Os valores de referência para os monócitos no sangue periférico são de 4% a 12%.

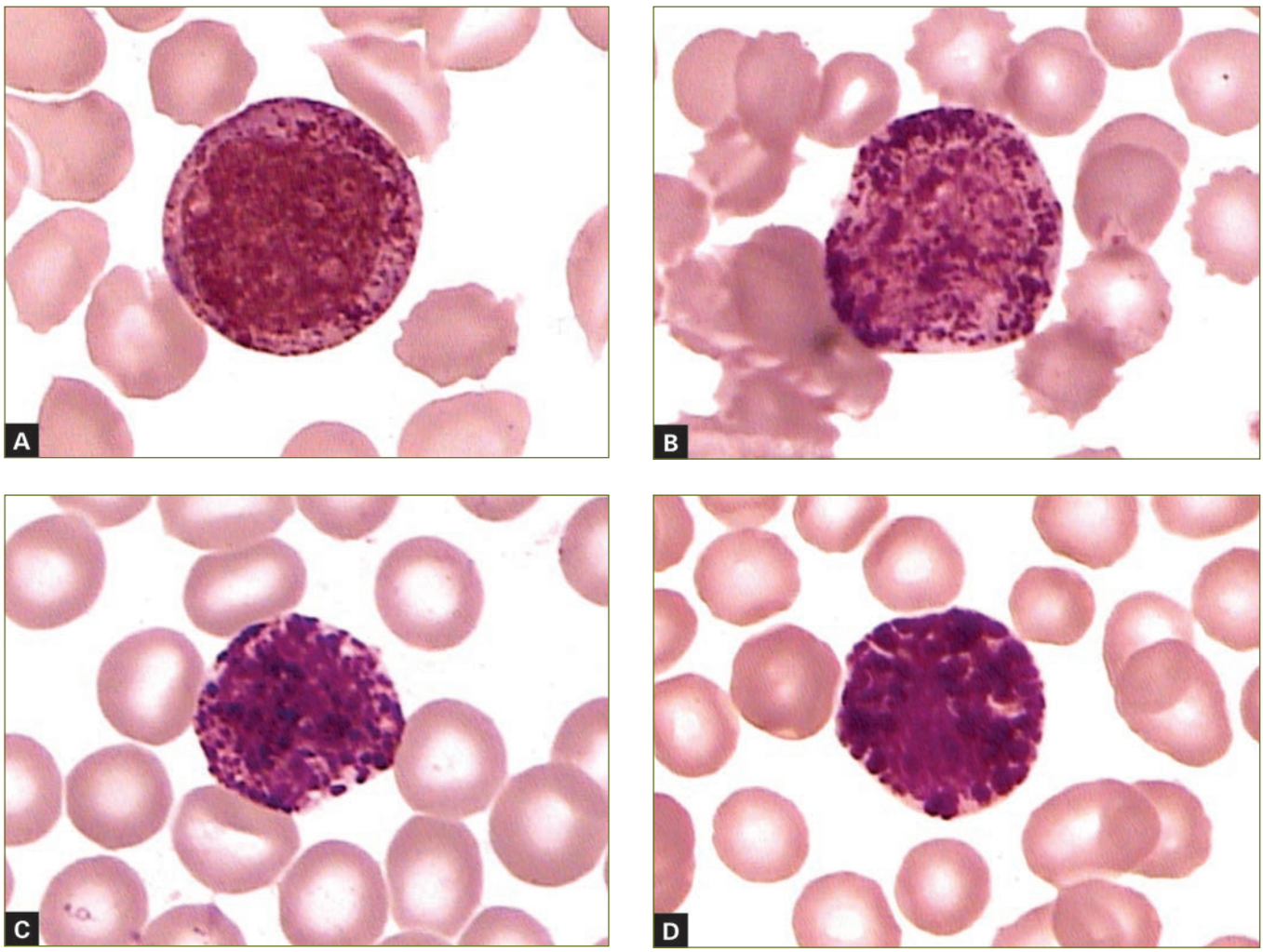


Figura 4.21 (**A** a **D**) Maturação dos basófilos. Mielócito basófilo (**A**); metamielócito basófilo (**B**); e formas maduras de basófilos (**C** e **D**) (2.000×)

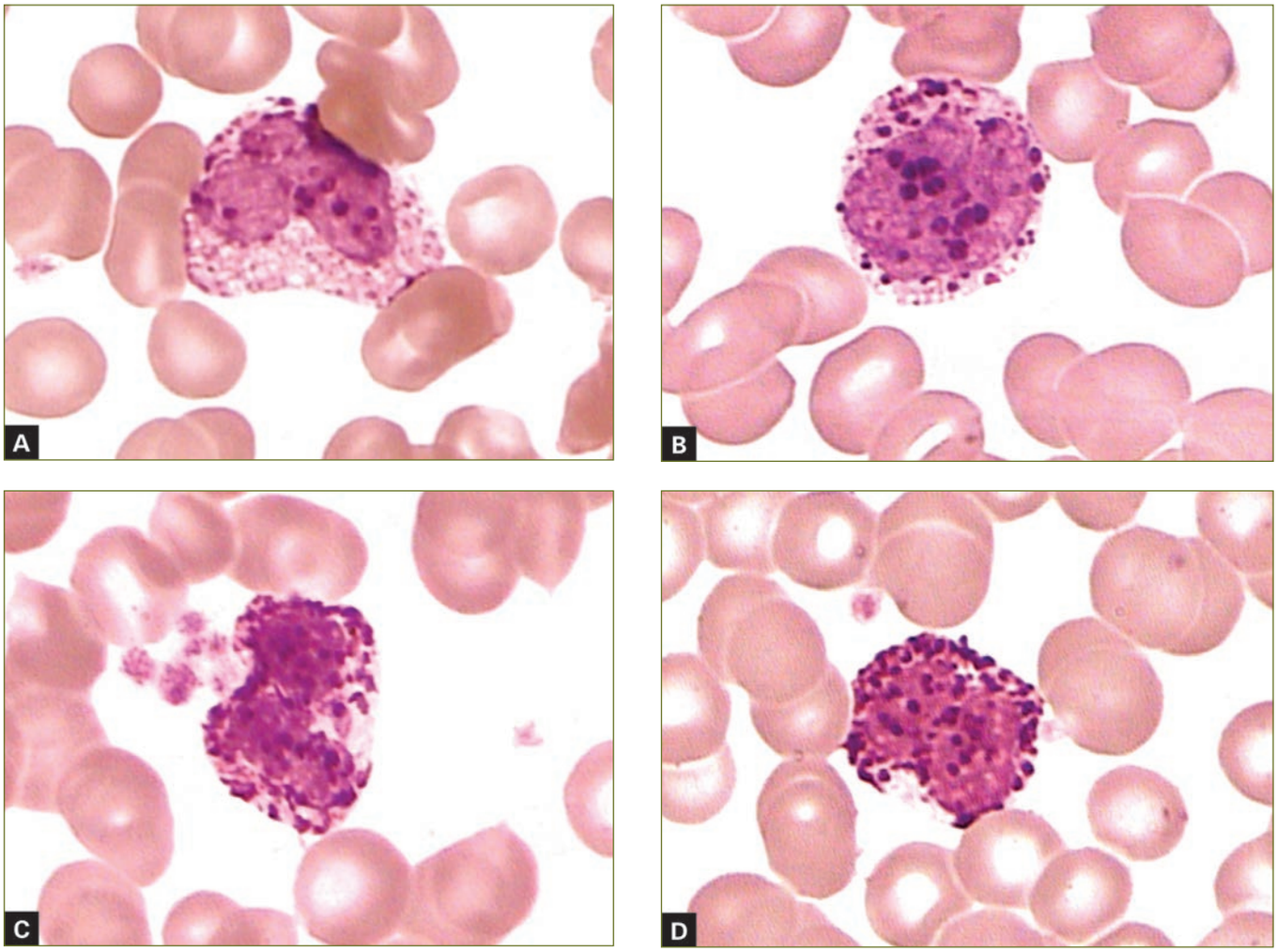


Figura 4.22 (**A** a **D**) Basófilos com alteração de grânulos, observados na síndrome mielodisplásica (2.000×)

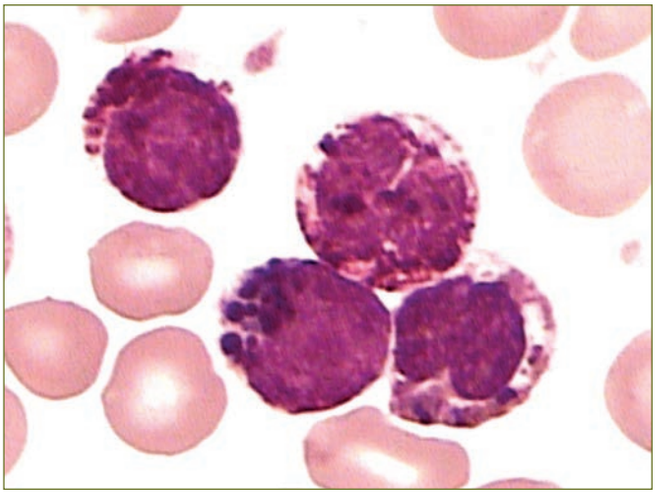


Figura 4.23 Basofilia observada na leucemia mieloide crônica em fase acelerada (2.000×)

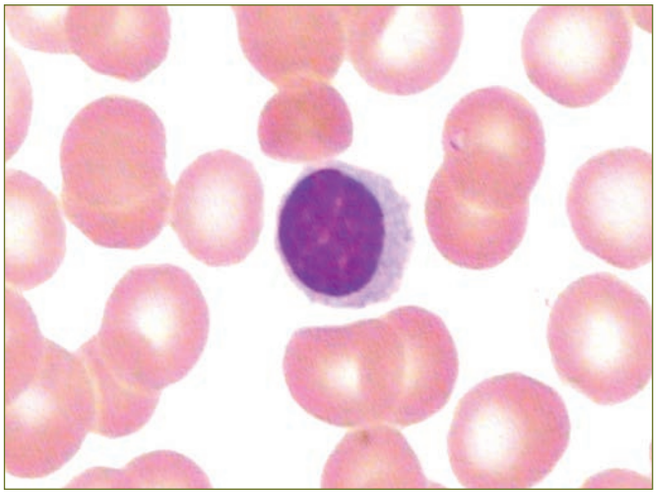


Figura 4.24 Linfócito pequeno (2.000×)

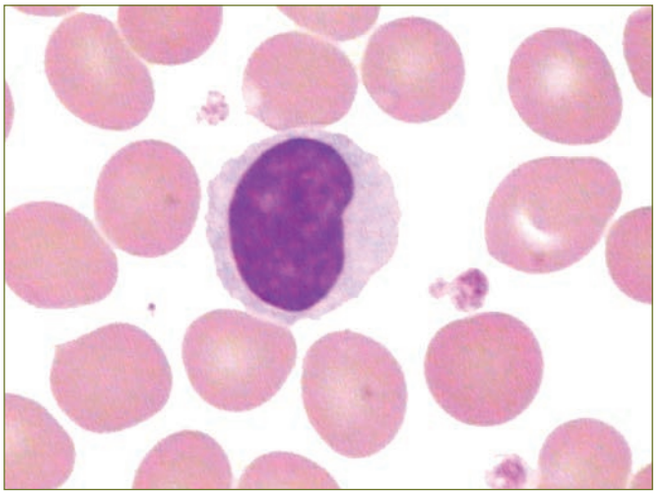


Figura 4.25 Linfócito grande (2.000×)

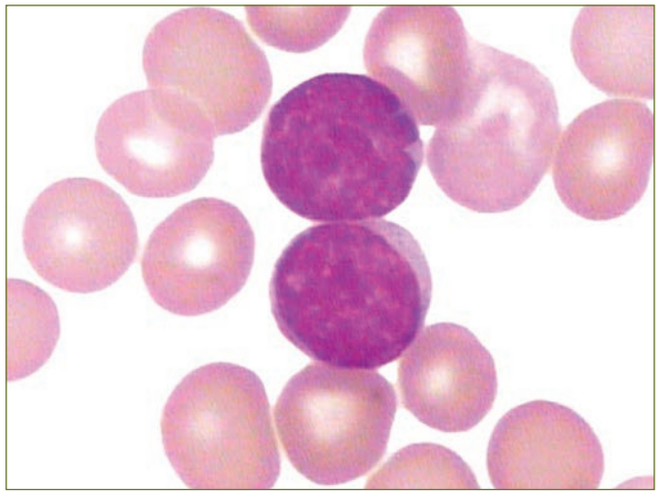


Figura 4.28 Blastos linfoides subtipo L1: linfoblastos pequenos com cromatina homogênea, sem nucléolo aparente e citoplasma escasso ou ausente (2.000×)

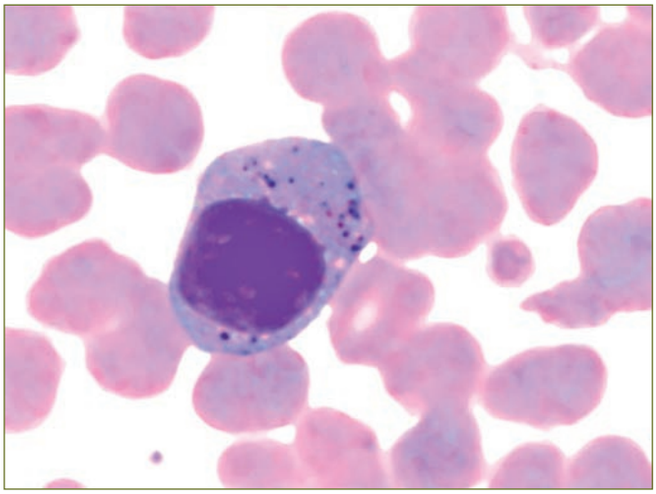


Figura 4.26 *Natural killer*: grande linfócito granular (2.000×)

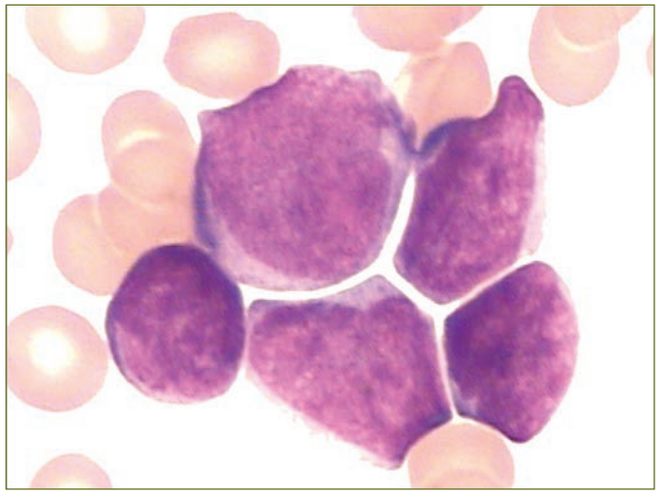


Figura 4.29 Blastos linfoides subtipo L2: linfoblastos apresentando tamanho, padrão da cromatina e relação núcleo/citoplasma variáveis (2.000×)

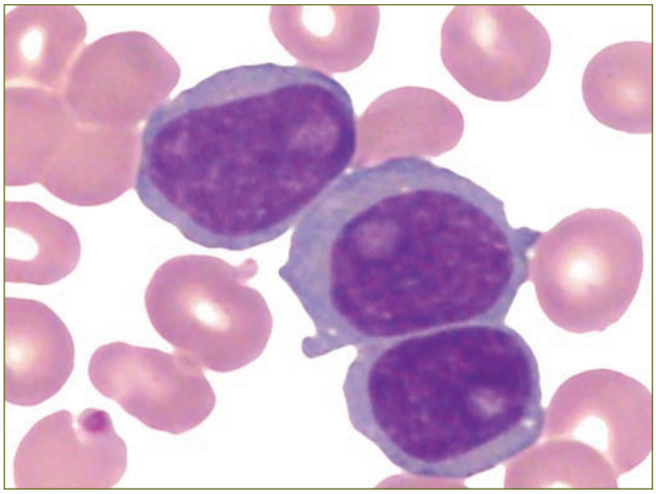


Figura 4.27 Prolinfócitos: destaque para o nucléolo grande e único (2.000×)

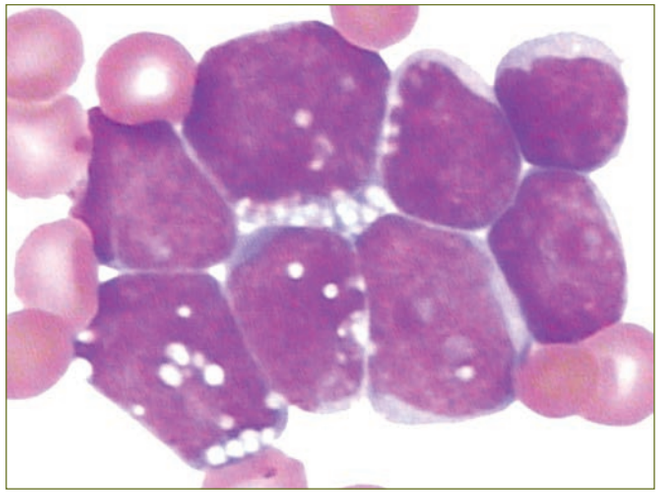


Figura 4.30 Blastos linfoides subtipo L3. Linfoblastos com vacuolização e aumento da basofilia citoplasmática. Núcleo apresentando cromatina frouxa ou com padrão variável e esboço de nucléolo (2.000×)

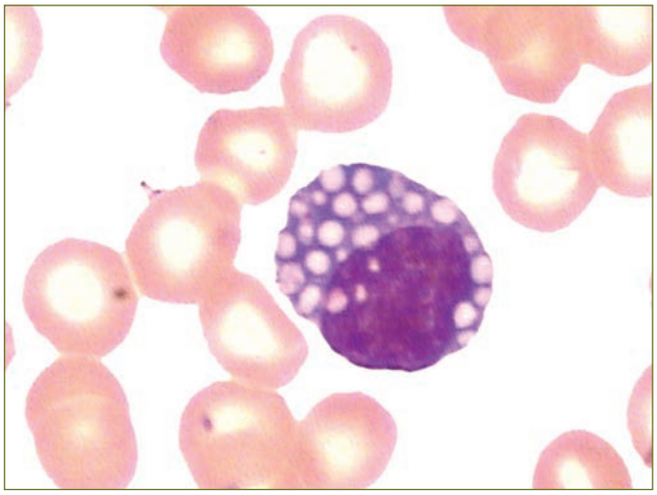


Figura 4.31 Célula de Mott (plasmócito com vacúolos de imunoglobulina M) (2.000×)

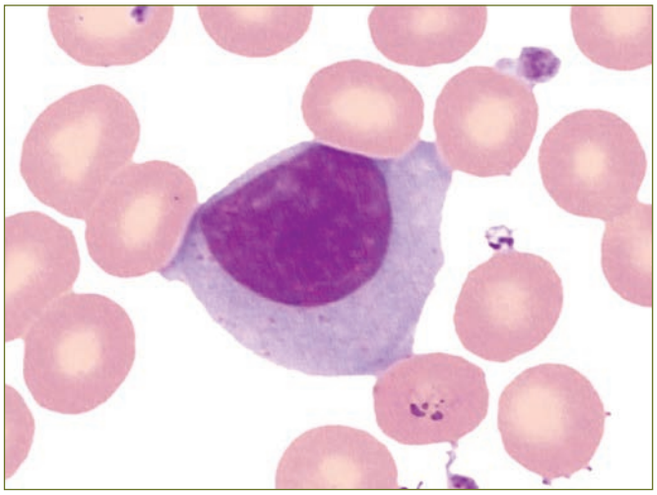


Figura 4.34 Linfócito atípico por polimorfismo e discreto aumento da basofilia citoplasmática (2.000×)

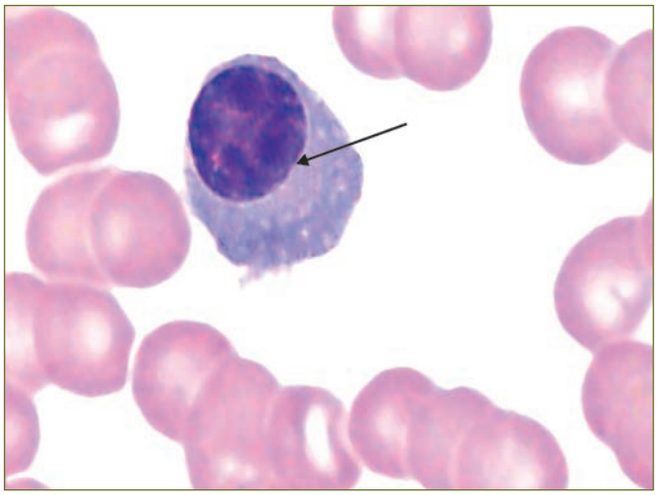


Figura 4.32 Plasmócito: linfócito B ativado (núcleo excêntrico). Detalhe para a zona de Golgi (*seta*) (2.000×)

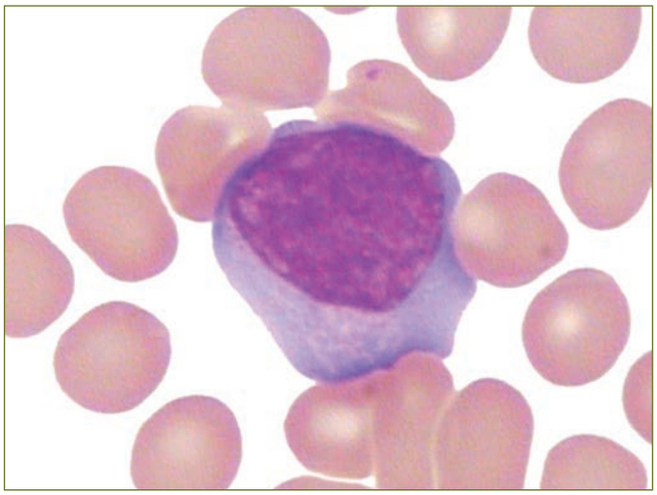


Figura 4.35 Linfócito atípico por polimorfismo nuclear e basofilia citoplasmática (2.000×)

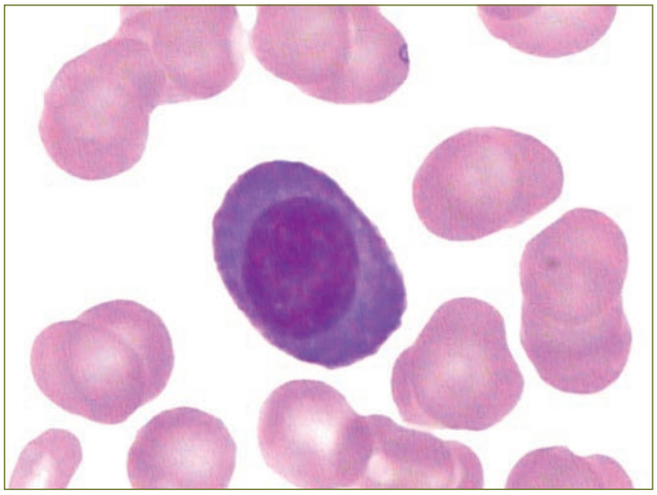


Figura 4.33 Linfócito plasmocitoide: observado, principalmente, na macroglobulinemia de Waldenström e no linfoma linfoplasmocítico (2.000×)

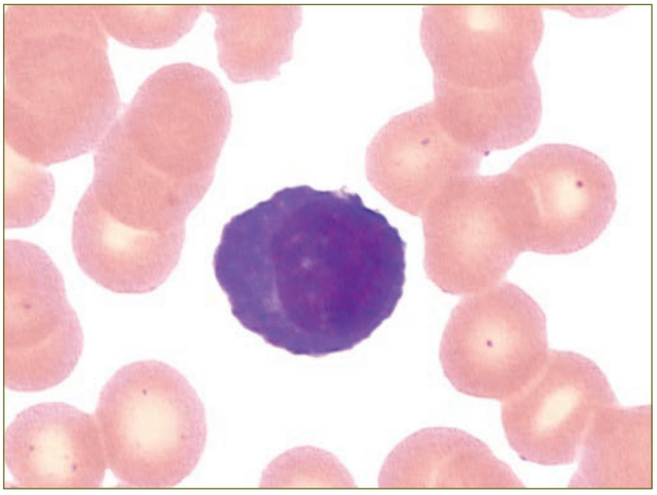


Figura 4.36 Linfócito atípico por hiperbasofilia citoplasmática (2.000×)

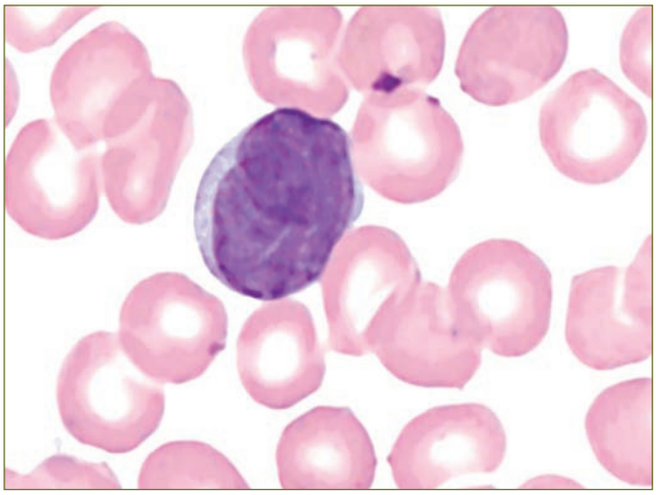


Figura 4.37 Célula linfoide convoluta de aspecto cerebriforme (célula de Sèzary) observada na micose fungoide/síndrome de Sèzary (2.000×)

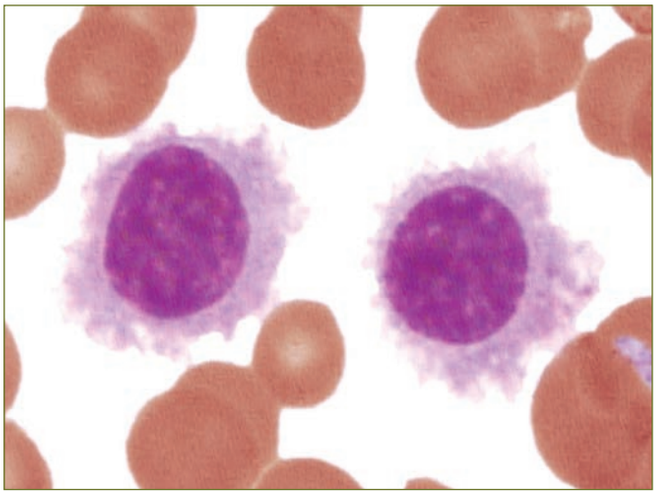


Figura 4.40 Tricoleucócitos. Também conhecidos como linfócitos pilosos, apresentam projeções citoplasmáticas uniformes. São observados na tricoleucemia (2.000×)

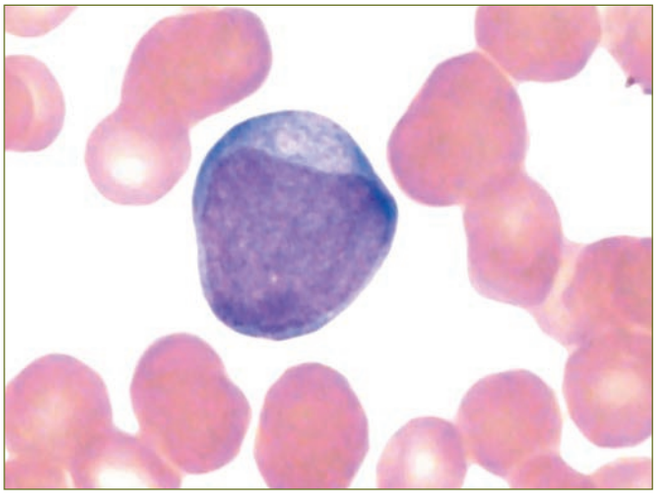


Figura 4.38 Célula linfoide de aspecto imaturo com cromatina intermediária (2.000×)

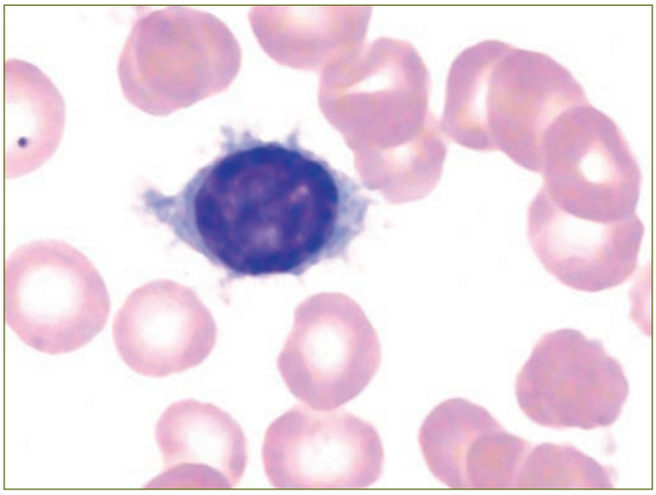


Figura 4.41 Linfócito viloso. Linfócito com cromatina compacta apresentando projeções citoplasmáticas polares. É observado no linfoma esplênico da zona marginal (2.000×)

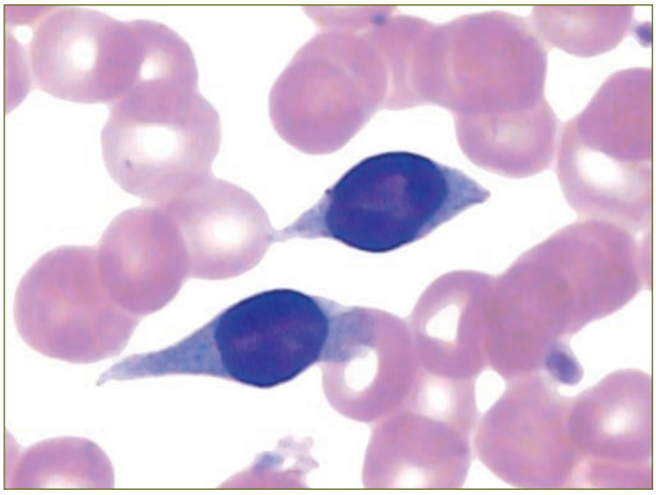


Figura 4.39 Célula linfoide alongada demonstrando fragilidade celular (2.000×)

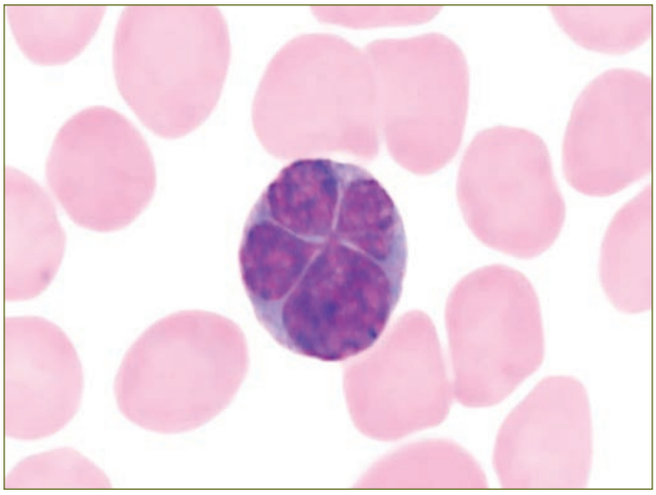


Figura 4.42 Célula em trevo. Também conhecida como *flower cell*, trata-se de célula linfoide pleomórfica e convoluta observada na leucemia/linfoma de células T do adulto (2.000×)

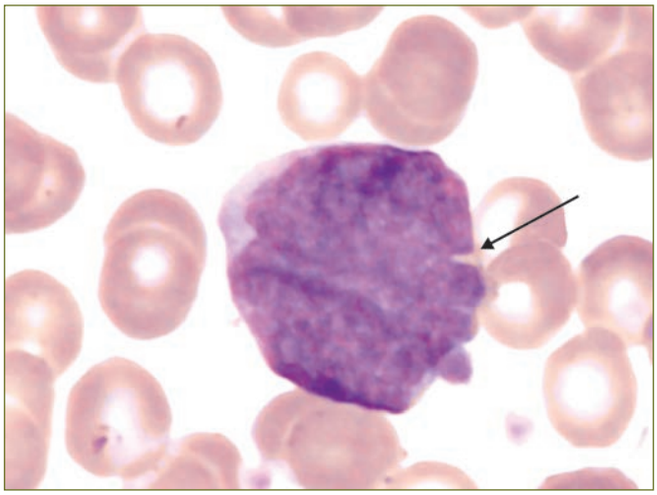


Figura 4.43 Célula linfoide com endentação (*seta*): observada no linfoma de células do manto (2.000×)

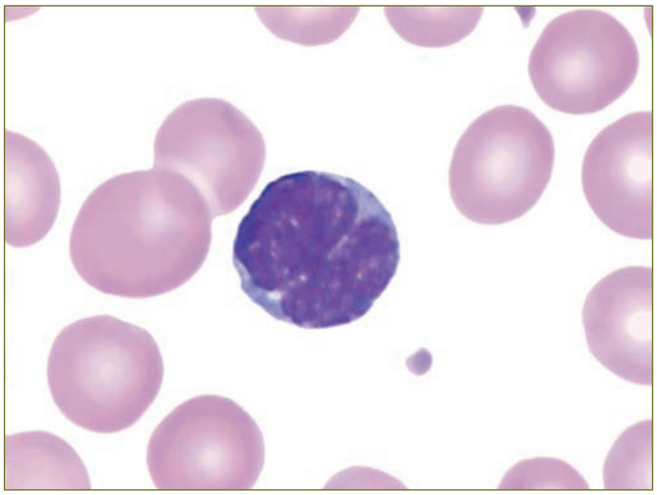


Figura 4.46 Célula linfoide clivada: observada com mais frequência no linfoma folicular (2.000×)

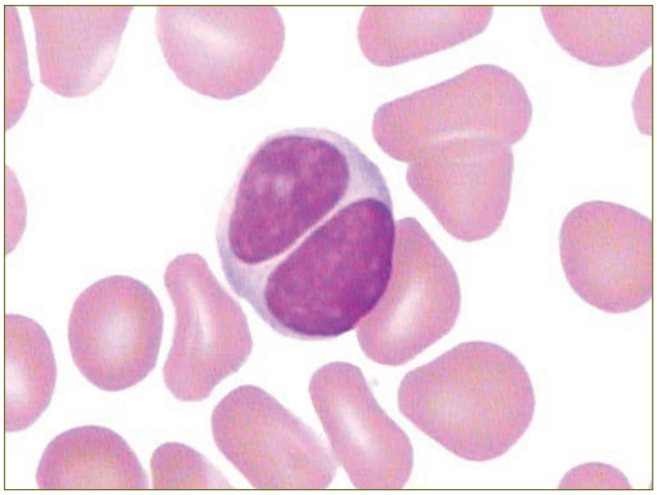


Figura 4.44 Célula linfoide binucleada: observada em processos linfoproliferativos (2.000×)

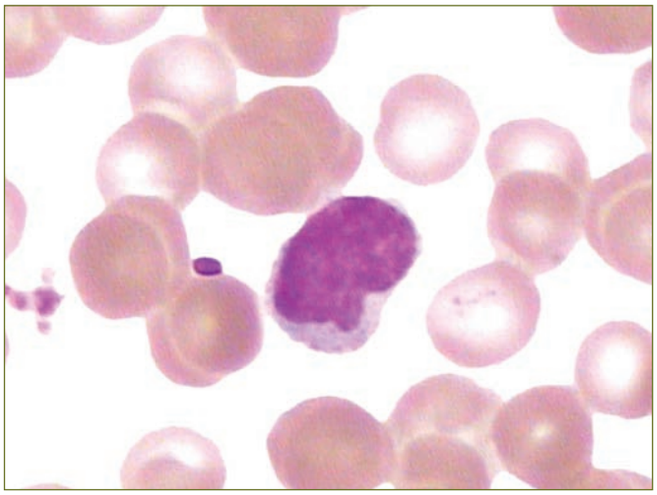


Figura 4.47 Célula linfoide com discreta irregularidade nuclear (2.000×)

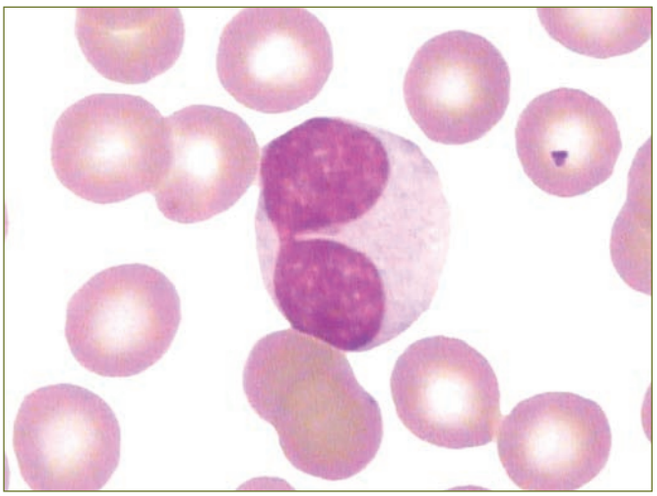


Figura 4.45 Linfócito bilobulado: observado em processos linfoproliferativos (2.000×)

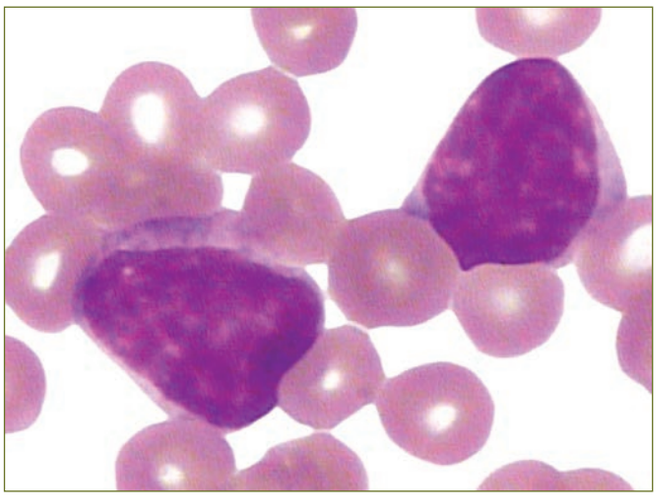


Figura 4.48 Células linfoides do linfoma difuso de grandes células B (2.000×)

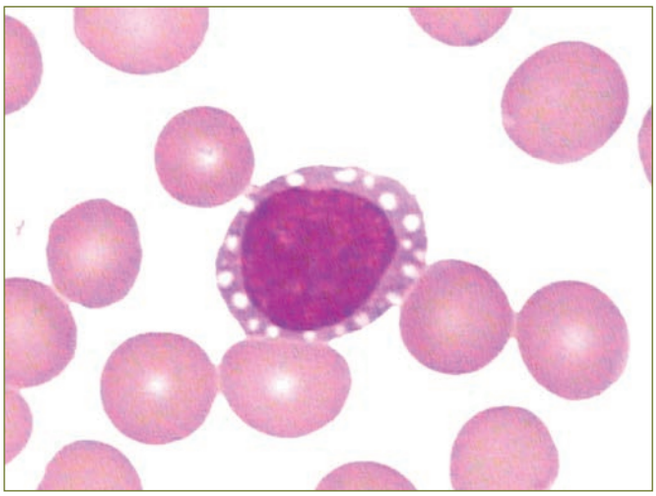


Figura 4.49 Linfócito com vacuolização: observado em doenças de depósito lisossômico ou em lâminas confeccionadas com o anticoagulante EDTA (2.000×)

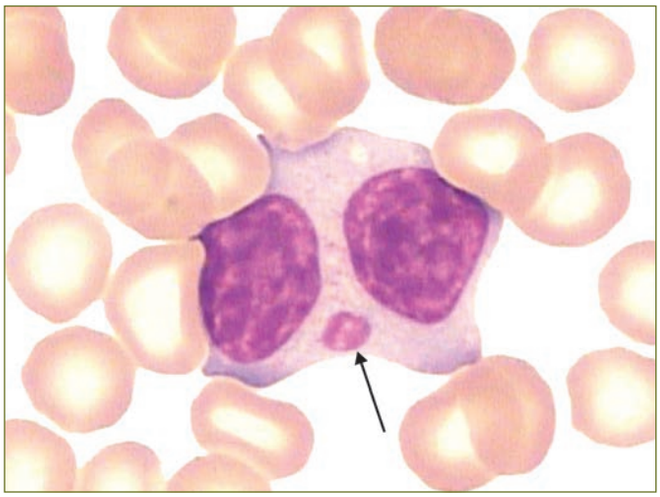


Figura 4.50 Linfócito binucleado com a presença de um micronúcleo (*seta*); instabilidade cromossômica (2.000×)

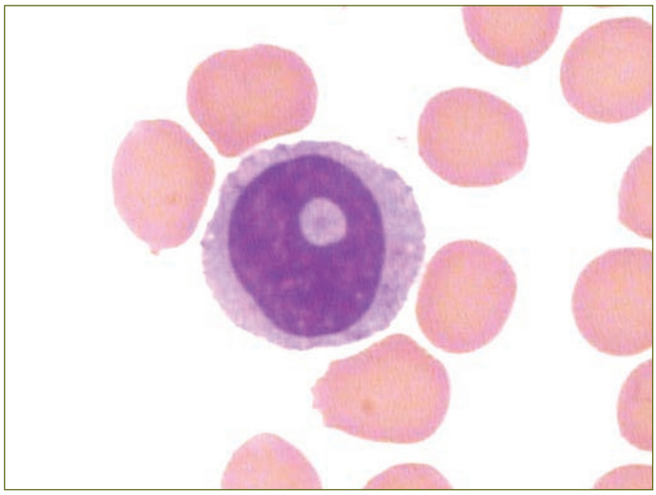


Figura 4.51 Linfócito em anel: observado nas síndromes mielodisplásicas (2.000×)

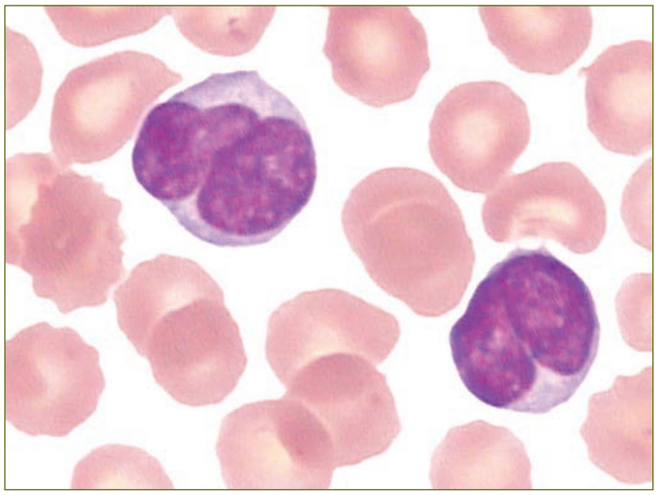


Figura 4.52 Linfócitos atípicos polilobulados: observados na coqueluche (2.000×)

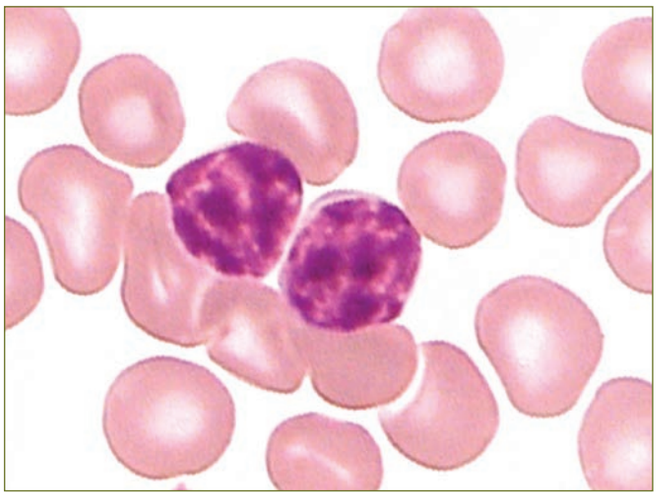


Figura 4.53 Linfócitos com cromatina condensada de aspecto "bola de futebol": observados na leucemia linfoide crônica (2.000×)

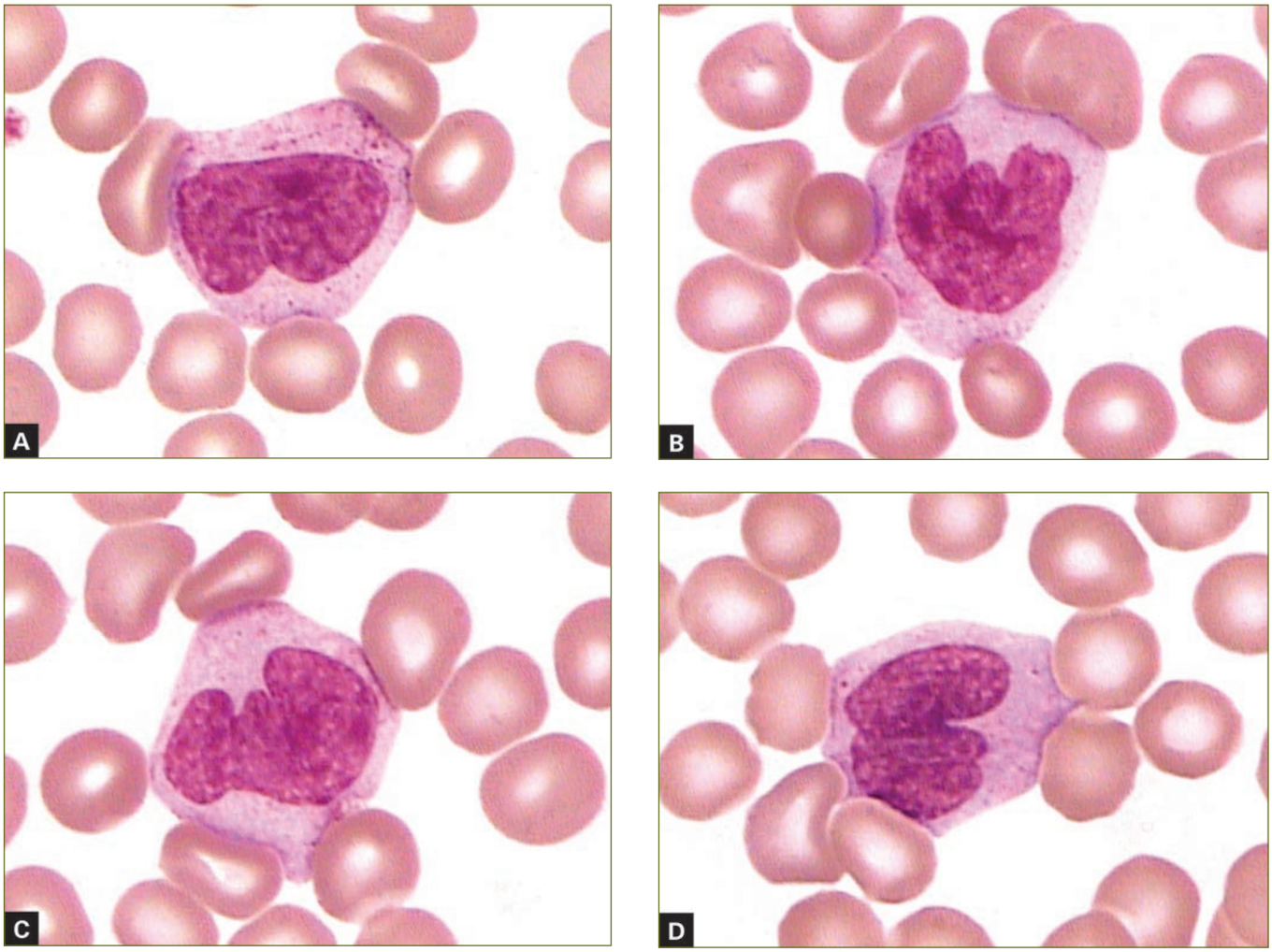


Figura 4.54 (**A** a **D**) Monócitos normais (2.000×)

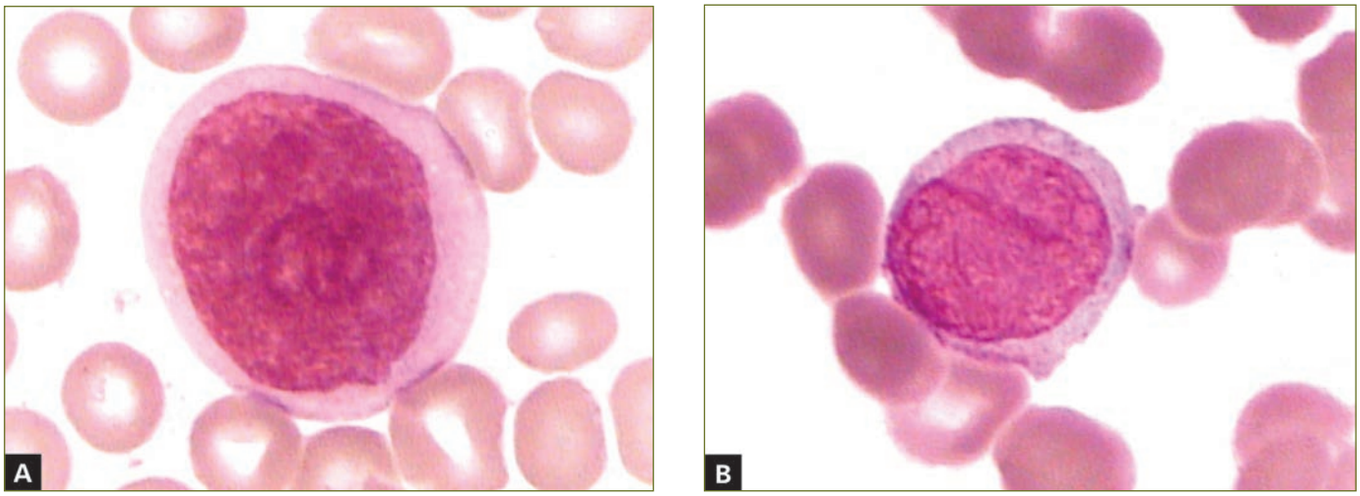


Figura 4.55 (**A** a **D**) Maturação do monócito. Monoblasto (**A**); promonócito precoce (**B**) (2.000×) (*continua*)

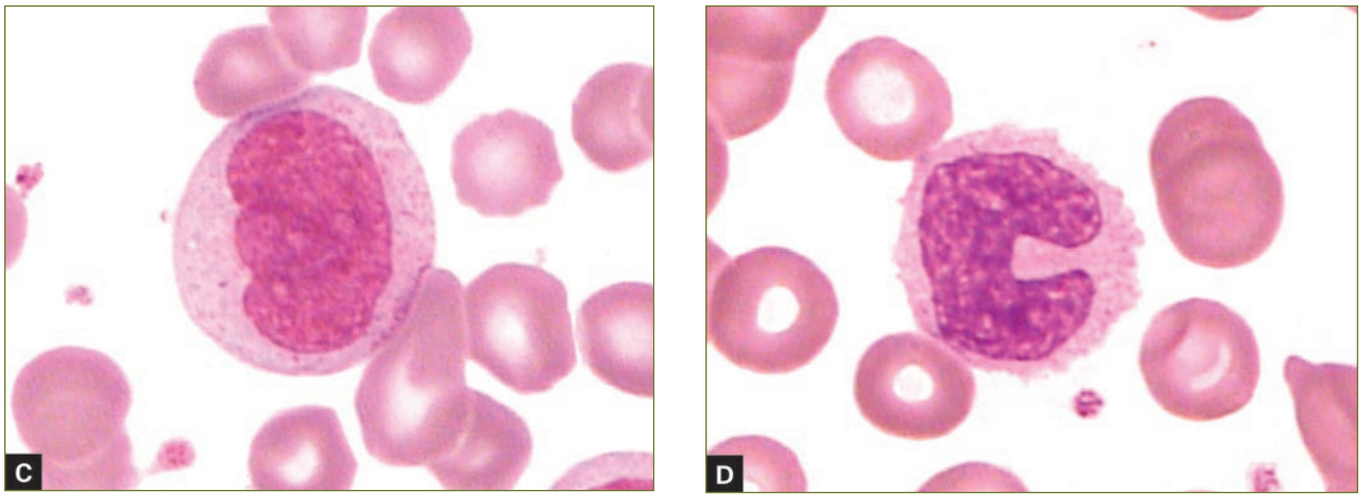


Figura 4.55 (**A** a **D**) (*continuação*) Maturação do monócito. Promonócito tardio (**C**); monócito (**D**) (2.000×)

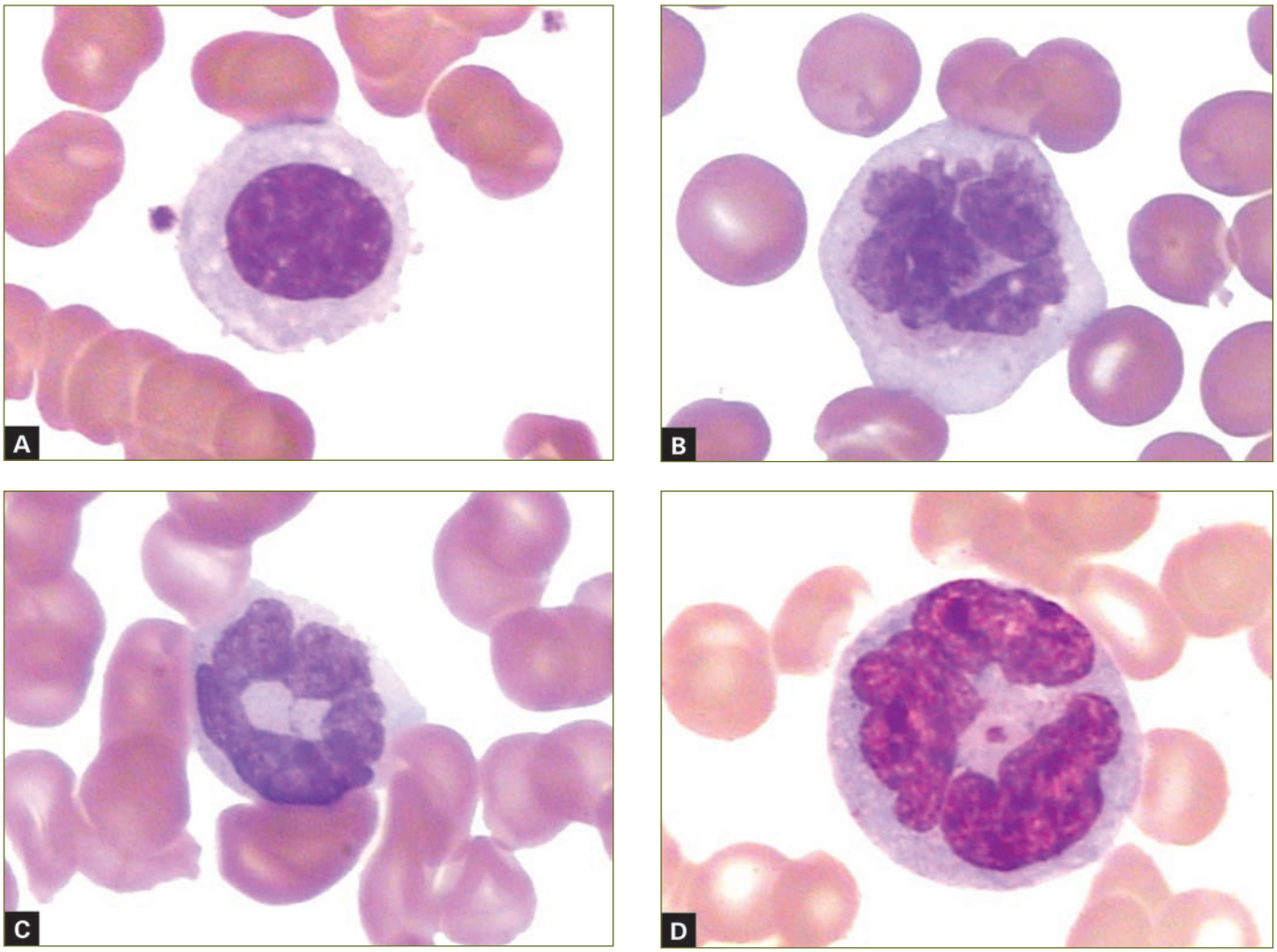


Figura 4.56 (**A** a **D**) Monócitos displásicos, com citoplasmas hipogranúlicos e núcleos bizarros, observados na síndrome mielodisplásica (2.000×)

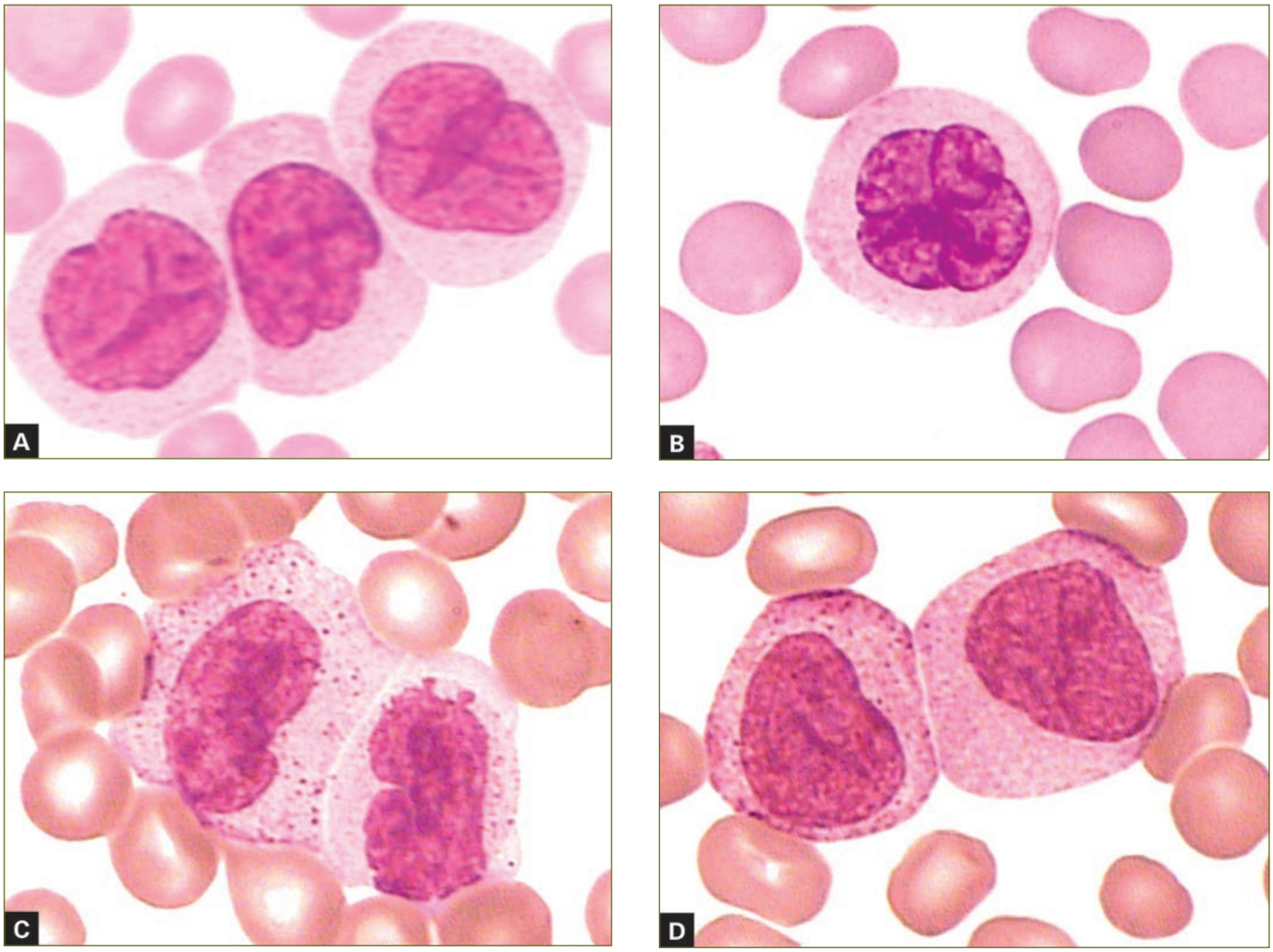


Figura 4.57 (**A** a **D**) Monócitos anômalos, com citoplasma, na maioria das vezes, com excesso de grânulos e núcleo geralmente com sobreposição (2.000×)

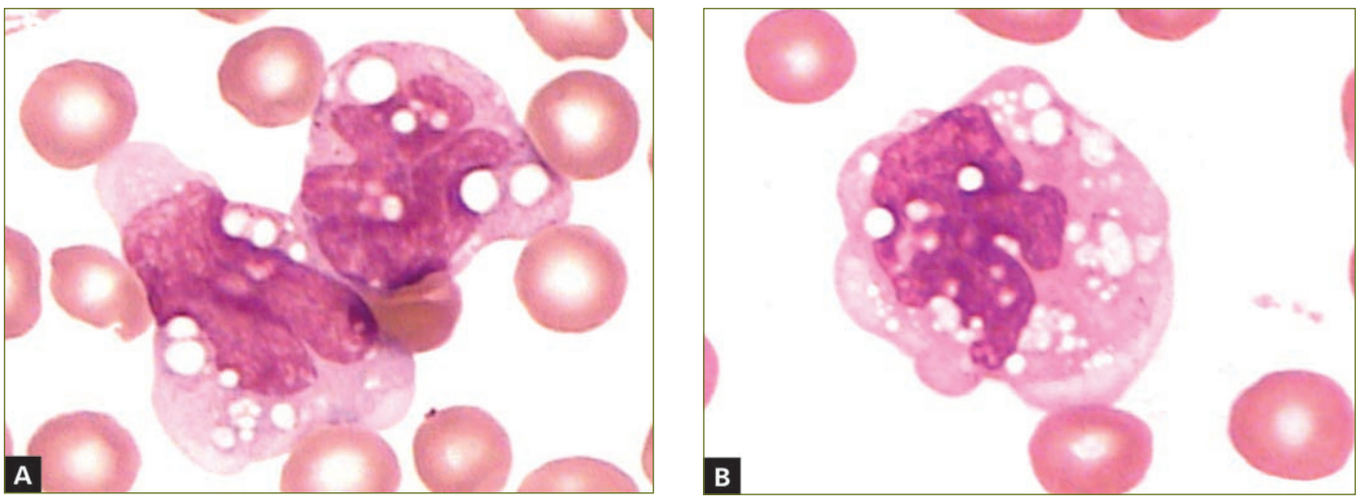


Figura 4.58 (**A** e **B**) Monócitos com vacuolização: observados mais frequentemente em processos infecciosos (2.000×)

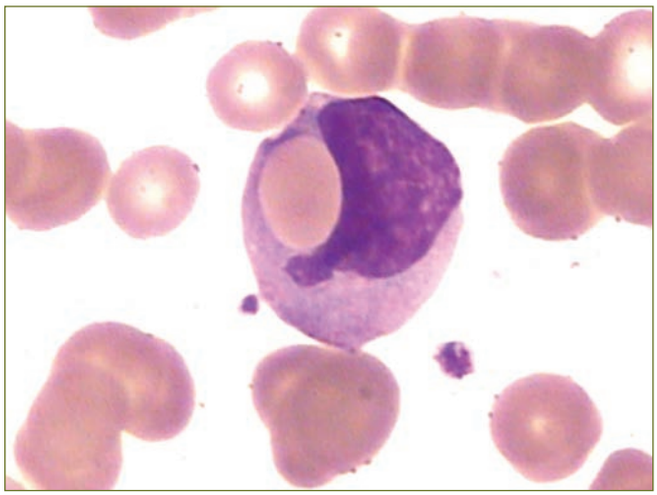


Figura 4.59 Monócito com hemácia fagocitada: observado raramente em processos autoimunes (2.000×)

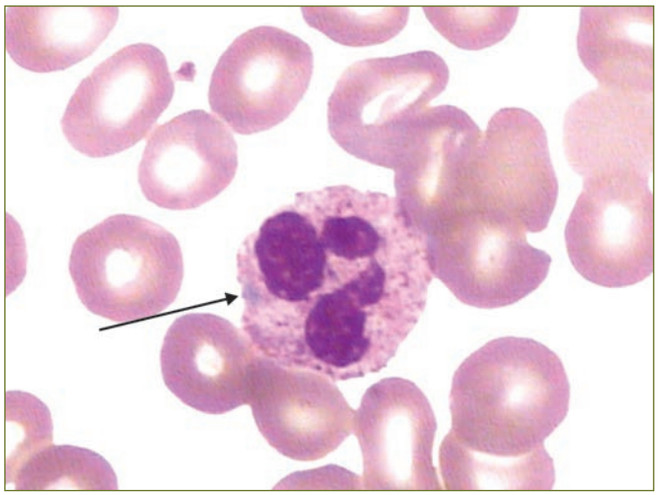


Figura 4.61 Corpúsculo de Döhle (*seta*) (2.000×)

CITOLOGIA DAS INCLUSÕES LEUCOCITÁRIAS

CORPÚSCULO DE DÖHLE

É uma inclusão leucocitária que ocorre apenas nos neutrófilos e costuma se apresentar na forma "oval" com uma coloração azul-pálida, frequentemente localizada na periferia da célula. Trata-se de um corpúsculo na maioria das vezes único, e representa a liquefação do retículo endoplasmático do neutrófilo (Figuras 4.60 e 4.61).

Os corpúsculos de Döhle são geralmente associados a quadros infecciosos graves, queimaduras e inflamação, na administração das citocinas G-CSF e GM-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos) e na gravidez. É muito comum haver granulação tóxica e vacuolização citoplasmática na mesma célula.

O corpúsculo de Döhle apresenta morfologia bastante semelhante à do corpúsculo de May-Hegglin e é muito frequente nos neutrófilos de gatos.

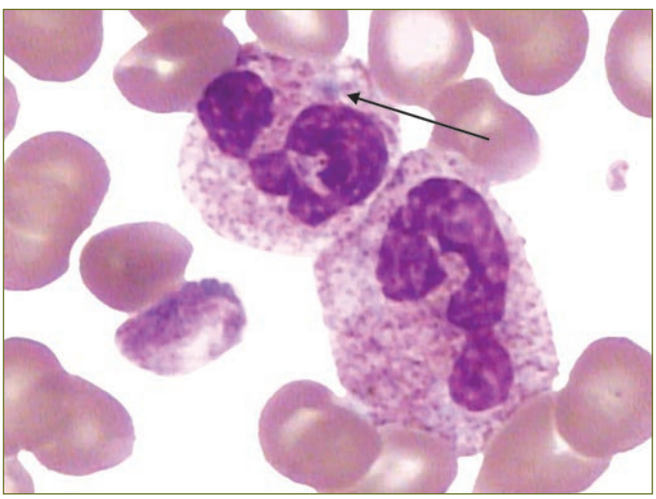


Figura 4.60 Corpúsculo de Döhle em neutrófilo com granulação tóxica (*seta*) (2.000×)

CORPÚSCULO DE MAY-HEGGLIN

O corpúsculo de May-Hegglin é uma inclusão de coloração azulada, aderida à parede celular dos neutrófilos. Contudo, pode ser observada também nos eosinófilos e basófilos, porém são menos identificadas nestas células devido à quantidade de grânulos (Figura 4.62). Ele está associado à existência de macroplaquetas e plaquetas gigantes no esfregaço sanguíneo, bem como ao surgimento de plaquetopenia.

É uma condição autossômica dominante, que corresponde ao retículo endoplasmático destruído. Geralmente, é assintomática e sem leucocitose e desvio à esquerda. A semelhança com o corpúsculo de Döhle é muito grande, porém o corpúsculo de May-Hegglin é mais proeminente.

SÍNDROME DE CHEDIAK-HIGASHI

É um distúrbio raro que se apresenta nos leucócitos sob forma de grandes inclusões eosinofílicas. Do mesmo modo, são observados grânulos com características tintoriais variáveis

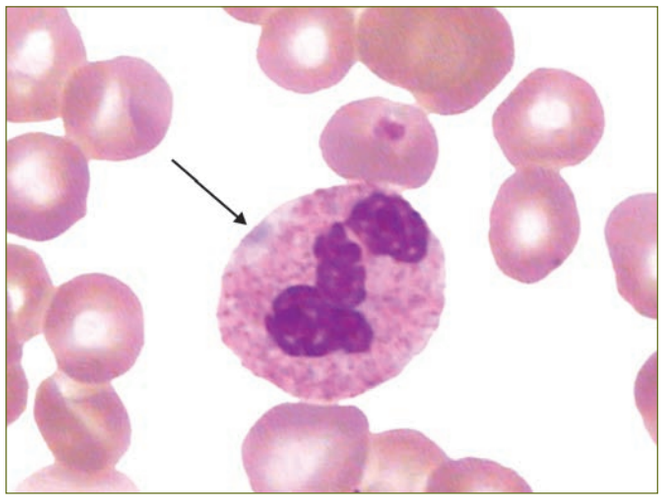


Figura 4.62 Corpúsculo de May-Hegglin (*seta*) (2.000×)

(Figuras 4.63 e 4.64). Essas inclusões podem acontecer em todas as células sanguíneas.

A síndrome de Chediak-Higashi é uma doença autossômica que causa comprometimento das funções celulares e frequentemente leva à fotofobia e ao albinismo oculocutâneo parcial. As alterações dessa síndrome também podem ocorrer durante infecções e hemorragias graves. Inclusões semelhantes podem ser observadas nas leucemias agudas e na síndrome mielodisplásica, porém são denominadas pseudo-Chediak-Higashi.

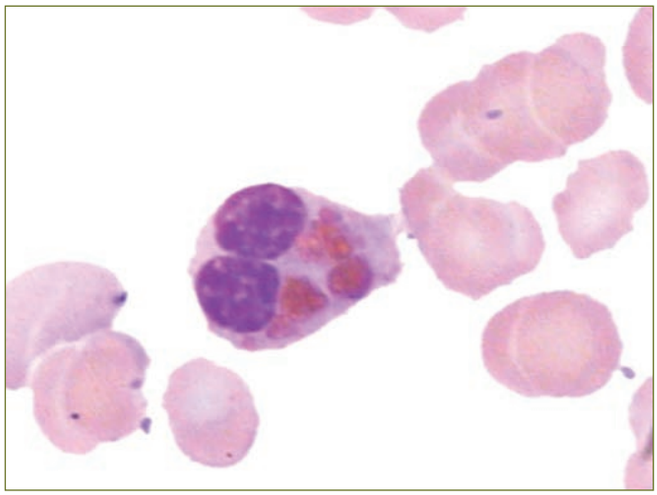


Figura 4.63 Síndrome de Chediak-Higashi: neutrófilo com grandes inclusões eosinofílicas (2.000×)

GRANULAÇÃO TÓXICA

A granulação tóxica apresenta-se com coloração basofílica e de maior tamanho que a granulação primária, que tem coloração azurófila (Figura 4.65). Geralmente, é classificada como granulação tóxica fina, média ou grosseira, podendo representar a precipitação da proteína ribossomal (RNA) causada pela metabolização tóxica dentro da célula. Pode ocorrer em neutrófilos segmentados, bastões e monócitos.

É observada principalmente em infecções agudas, inflamações graves, terapia com estimuladores de colônia de granulócitos e macrófagos humanos (G-CSF e GM-CSF), gravidez, queimaduras e tratamento quimioterápico, entre outros. Células normais podem apresentar falsas granulações tóxicas em coloração exposta a tempo prolongado ou diminuição do pH da solução de coloração.

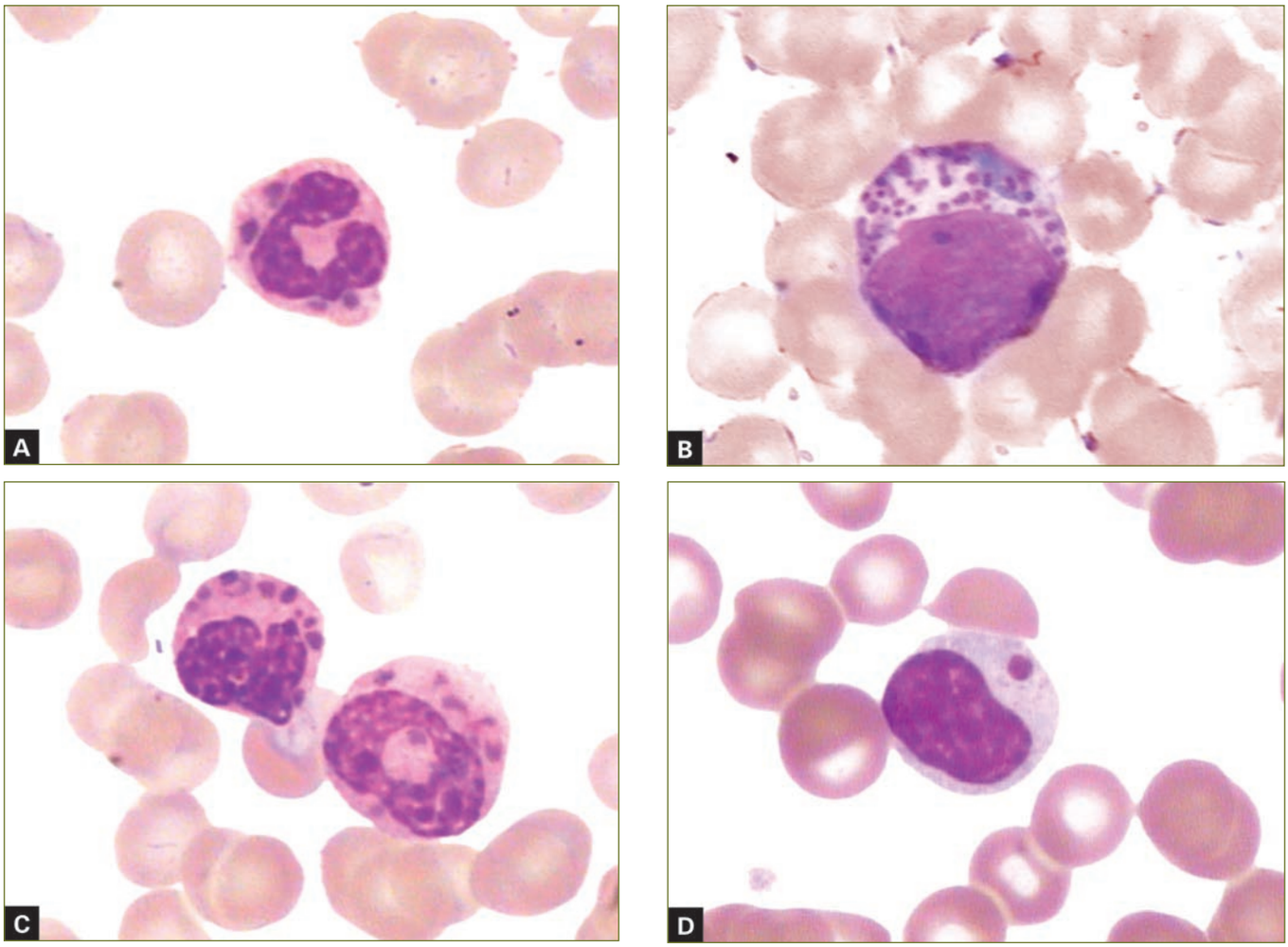


Figura 4.64 (**A** a **D**) Síndrome de Chediak-Highasi: inclusões com características tintoriais variáveis em diversos tipos de leucócitos (2.000×)

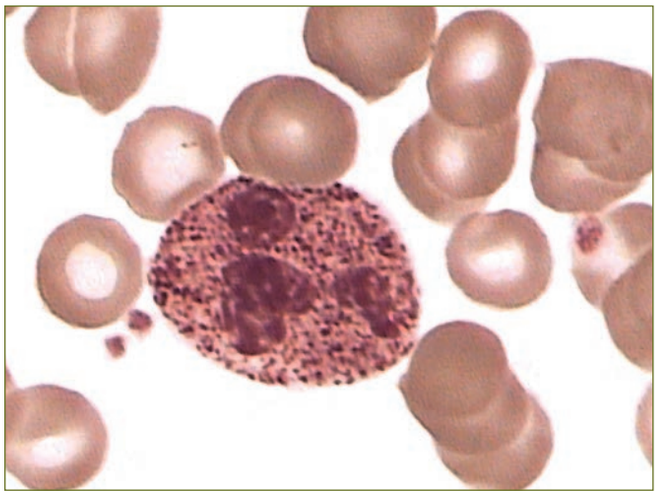


Figura 4.65 Neutrófilos com granulações tóxicas (2.000×)

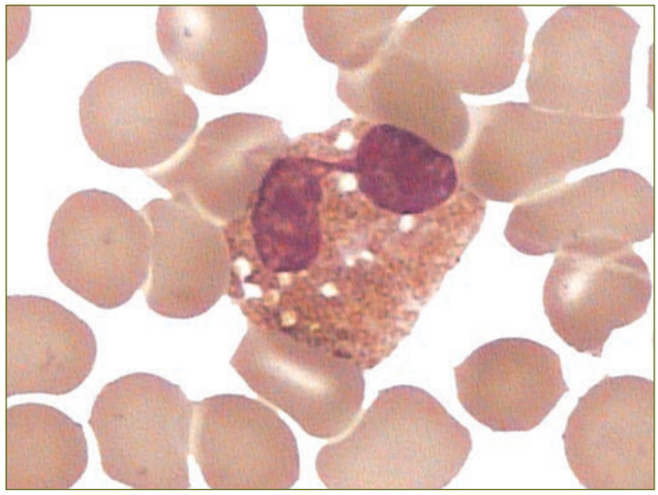


Figura 4.67 Vacuolização citoplasmática no eosinófilo (2.000×)

VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA

A vacuolização citoplasmática nos leucócitos é bastante inespecífica e ocorre por diferentes causas, de acordo com o tipo de leucócito acometido, bem como em casos de pacientes em tratamento quimioterápico ou esfregaços sanguíneos confeccionados com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A rara anomalia de Jordan também provoca vacuolização citoplasmática em todos os leucócitos, inclusive nos precursores mieloides.

Nos neutrófilos, as vacuolizações citoplasmáticas ocorrem da fusão entre os grânulos com vacúolos fagocíticos, com perda do conteúdo do lisossomo secundário (Figura 4.66). A principal causa é a infecção bacteriana, porém a ingestão aumentada de álcool também provoca vacuolização. No entanto, esta é mais frequente nos precursores mieloides.

Na síndrome hipereosinofílica, é comum o surgimento de eosinófilos com vacúolos no citoplasma. No entanto, estes vacúolos também podem ser vistos nas eosinofilias reacionais ou em algumas desordens adquiridas (Figura 4.67).

O citoplasma dos monócitos pode apresentar vacúolos ocasionalmente, mas em pequena quantidade e em poucas células. Contudo, nas infecções bacterianas, pode ocorrer evidente aumento da vacuolização citoplasmática (Figura 4.68).

Geralmente, a vacuolização citoplasmática nos linfócitos (Figura 4.69) ocorre em doenças de sobrecarga lisossomal autossômica recessiva por deficiência enzimática. O produto metabólico da vacuolização pode ser lipídio, como na doença de Wolman, ou glicogênio, como na doença de Pompe, entre outros.

CÉLULAS DE MOTT

As células de Mott são plasmócitos com diversos vacúolos de imunoglobulinas de tamanho e quantidade variáveis no citoplasma da célula. O surgimento desta célula é bastante frequente em casos reativos, porém pode ocorrer também em doenças das células plasmáticas.

A célula de Mott também é conhecida como célula morular, célula em uva ou célula em amora. Os vacúolos desse tipo de célula são retículos endoplasmáticos com grande quantidade de imunoglobulinas da classe M (IgM).

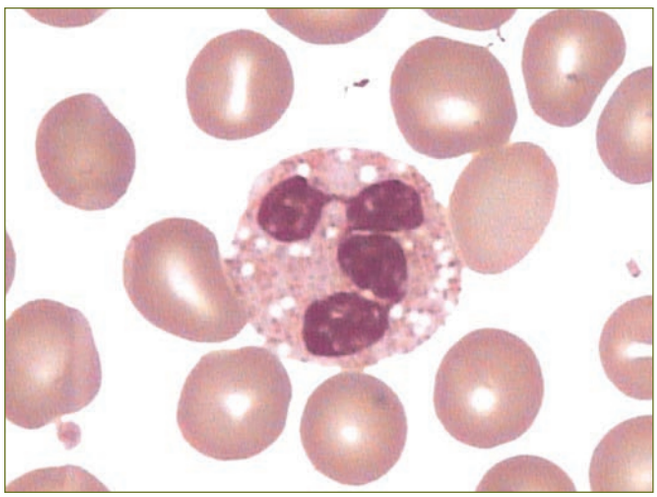


Figura 4.66 Vacuolização citoplasmática no neutrófilo (2.000×)

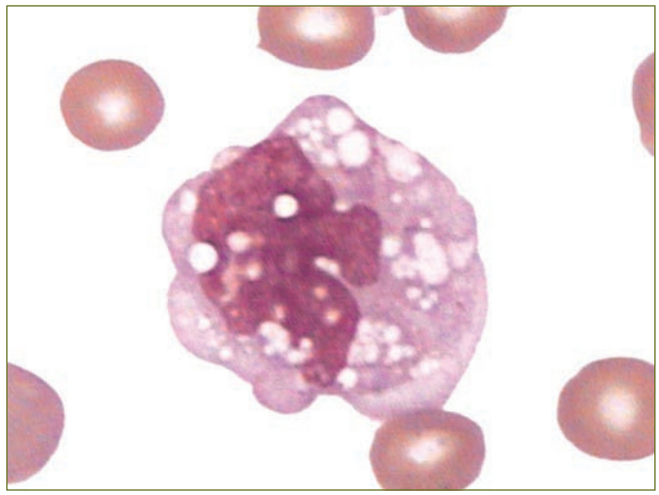


Figura 4.68 Vacuolização citoplasmática no monócito (2.000×)

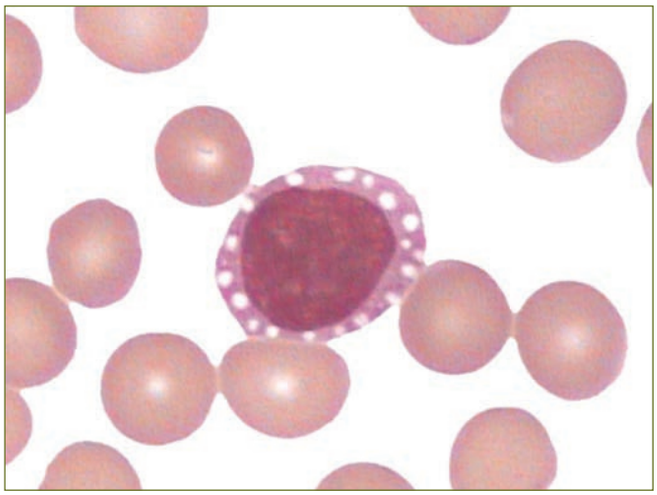


Figura 4.69 Vacuolização citoplasmática no linfócito (2.000×)

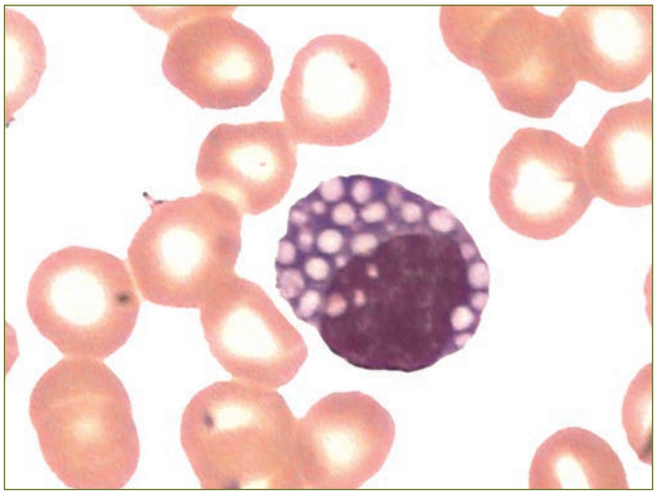


Figura 4.70 Célula de Mott: plasmócito com vacúolos de IgM (2.000×)

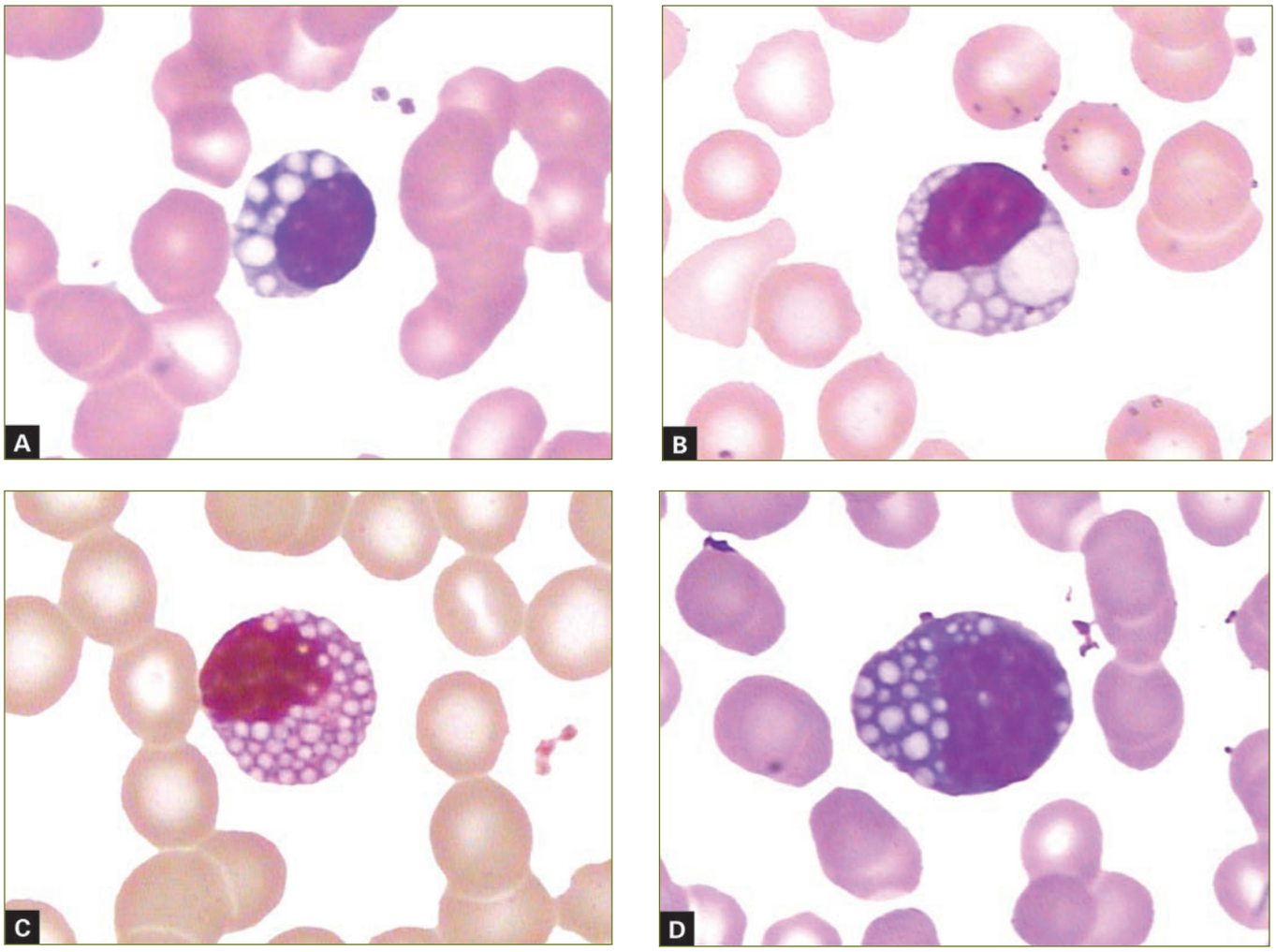


Figura 4.71 (**A** a **D**) Células de Mott: plasmócitos em diversas formas de apresentação com vacúolos de IgM (2.000×)

CÉLULA FLAMEJANTE

A célula flamejante é também denominada célula em chama e tem uma inclusão rica em glicogênio que circunda toda a célula por dentro aderida à membrana. Tal inclusão ocorre unicamente nos plasmócitos (Figura 4.72).

Esta rara inclusão ocorre menos frequentemente no sangue periférico e é bastante sugestiva de neoplasias plamocíticas, porém raramente pode surgir em plasmócitos reativos. O surgimento desta célula está mais fortemente ligado ao mieloma múltiplo IgA, mas pode ocorrer no mieloma IgG e IgM.

LEISHMANIA

A *Leishmania* é um protozoário da ordem Trypanosomatida, que, de acordo com a espécie, corresponde a três entidades clínicas: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a leishmaniose entre as seis endemias mais importantes do mundo, diante da ocorrência nas Américas, na Europa (Mediterrâneo), na África, na Ásia e no Oriente Médio. No Brasil, a *Leshmania* está presente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. A *Leishmania* apresenta descrições que remontam ao século I d.C. e, nas Américas, há relatos de leishmaniose de 400 d.C. Os vetores consistem em várias espécies do gênero *Lutzomyia* (novo mundo) ou *Phleblotomus* (velho mundo). As fêmeas destes mosquitos alimentam-se de sangue e os machos, de néctar das plantas. Os hospedeiros da *Leishmania* com manifestações viscerais atingem cães domésticos, canídeos silvestres e o homem. Enquanto isso, as que apresentam manifestações tegumentares afetam animais como gambá, tatu, tamanduá, canídeos, preguiça, primatas, cão e homem.

A leishmaniose visceral (calazar) é causada pela *Leishmania donovani*. No homem, as formas amastigotas são encontradas nas células do sistema reticuloendotelial, localizadas principalmente no baço, no fígado e na medula óssea (Figura 4.73), e raramente são vistas no sangue periférico dentro dos fagócitos. Enquanto isso, nos roedores e na raposa, as formas amastigotas são encontradas no sistema reticuloendotelial visceral, cutâneo e frequentemente no sangue periférico.

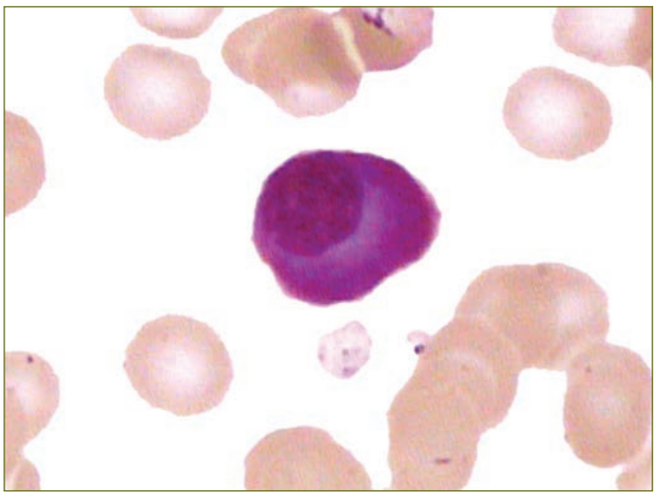


Figura 4.72 Célula flamejante: plasmócito com inclusão de glicogênio (2.000×)

A leishmaniose cutânea apresenta formas amastigotas nas úlceras primárias localizadas no tecido cutâneo (Figura 4.74) (local da picada do mosquito), sendo a mais comum entre os tipos de leishmaniose. Mais de 20 tipos de *Leishmania* podem causar a leishmaniose cutânea. A leishmaniose mucocutânea é a forma mais temida das leishmanioses cutâneas, pois produz lesões destrutivas e pode desfigurar a face. Costuma ser causada pela *Leishmania (viannia) braziliensis*.

O diagnóstico da leishmaniose consiste em testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI), a reação de fixação do complemento (RFC) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), além da pesquisa do parasito em esfregaços de punção de medula óssea, baço, fígado, linfonodos, úlceras cutâneas e, raramente, sangue periférico. Atualmente, outros critérios foram adotados para o diagnóstico da leishmaniose, entre eles a análise de fragmentos de restrição de DNA do cinetoplasto, a hibridização do DNA nuclear e a tipagem isoenzimática (que possibilitam a identificação de grupos de estirpes ou zimodemos). Geralmente, o tratamento em pacientes acometidos com as diversas formas de leishmaniose apresenta bons resultados com a cura total dos pacientes.

HISTOPLASMA CAPSULATUM

A histoplasmose é uma micose primitivamente pulmonar, em geral benigna. Apenas raríssimos casos evoluem para as formas graves disseminadas.

O hábitat deste fungo é geralmente o solo, sobretudo naquele associado a aves (pardais, pombos, galináceos) e morcegos. O *Histoplasma* não provoca lesões nessas aves. No entanto, o morcego é sujeito a infecções por *Histoplasma*.

Depois do homem, o cão é o animal mais afetado pela histoplasmose, porém há uma lista de numerosos carnívoros, marsupiais e roedores, entre outros, atingidos pela infecção por *Histoplasma*. A distribuição geográfica desta micose é universal, porém há uma predominância absoluta de incidência nos EUA, com mais de 35 milhões de casos, apresentando poucas mortes e comprovando a benignidade da doença.

Em geral, é pelo aparelho respiratório que o indivíduo se infecta. Contudo, pode ocorrer por meio do aparelho digestivo e do tegumento cutâneo também. Clinicamente, a histoplasmose é dividida em três formas: assintomática, pulmonar e disseminada:

- A forma assintomática representa 95% dos casos de histoplasmose; em alguns casos, pode ocorrer formação de calcificação pulmonar, a qual caminha naturalmente para a cura espontânea.
- Sintomas de gripe, tosse, perda de peso e eritema podem ocorrer na forma pulmonar da histoplasmose, mas o prognóstico é bom para maioria absoluta dos casos nesta forma. Pacientes com a forma pulmonar grave respondem muito bem ao tratamento com anfotericina B.
- A forma disseminada apresenta-se em pequena percentagem: cerca de um caso para cada 50 mil na forma pulmonar. Ocorre com mais frequência em pacientes imunodeprimidos, por exemplo: pacientes com AIDS, leucemias

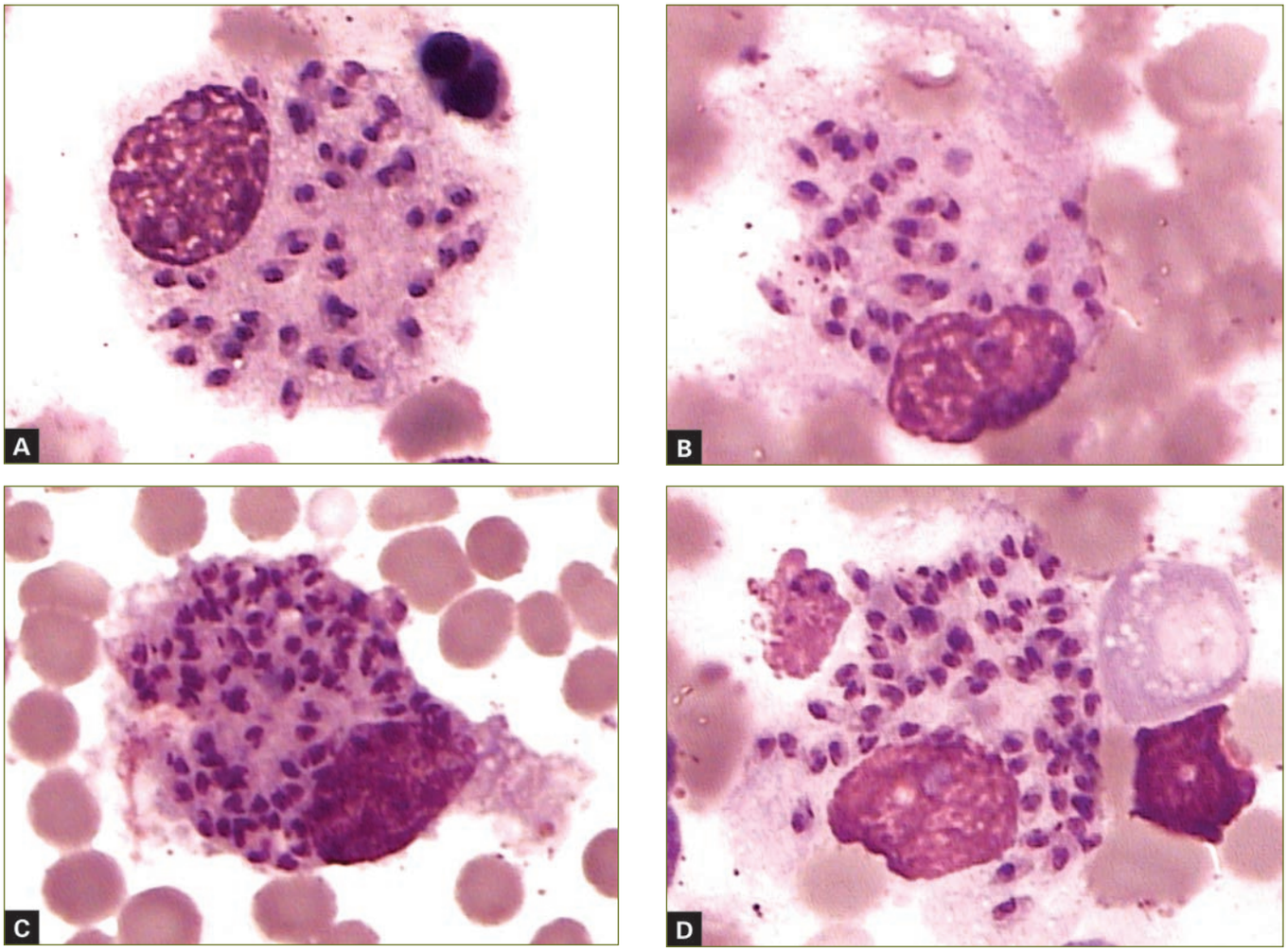


Figura 4.73 (**A** a **D**) *Leishmania* sp., forma amastigota intracelular: amostra coletada da medula óssea (2.000×)

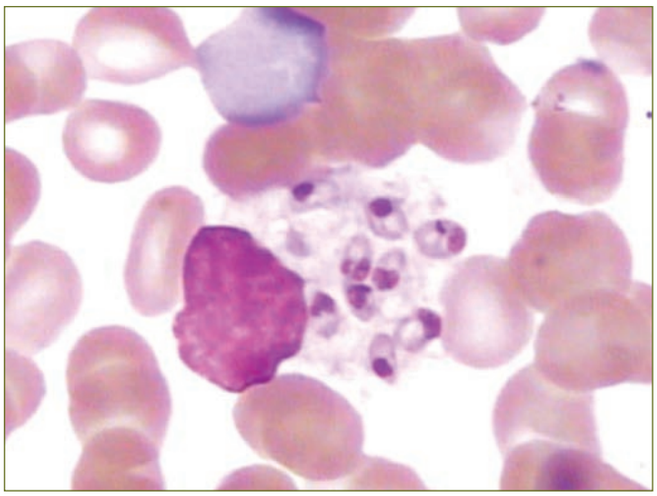


Figura 4.74 *Leishmania* sp., forma amastigota intracelular: amostra coletada da lesão da pele (botão do oriente) (2.000×)

e linfomas. A mortalidade em pacientes imunodeprimidos fica acima dos 90% dos casos. Nos pacientes com AIDS, observa-se disseminação do *Histoplasma* na região cutânea da face, no pescoço e no tórax, com semelhança com o molusco contagioso.

No sangue periférico, é muito raro o *H. capsulatum*. Quando presente, está localizado como inclusão citoplasmática nos neutrófilos e nos monócitos. Pode se apresentar único ou em vários na mesma célula, conforme é visto nas Figuras 4.75 e 4.76.

GANGLIOSIDOSE TIPO 1

A gangliosidose tipo 1 (GM1), ou doença de Norman-Landing, é uma rara doença de depósito lisossômico, causada pela deficiência da enzima betagalactosidade, que provoca o acúmulo de esfingolipídios no sistema nervoso, nas vísceras e nas células. É uma doença genética de caráter autossômico recessivo que apresenta uma incidência estimada de 1 caso para cada 100 mil a 200 mil nascimentos/vivos, embora sua

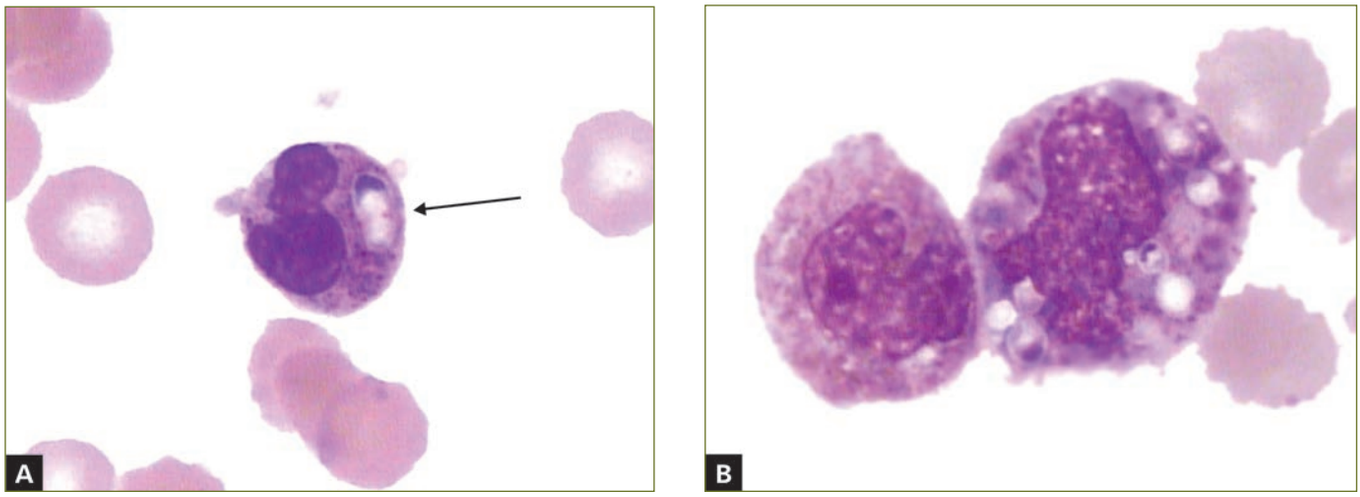


Figura 4.75 (**A** e **B**) *Histoplasma capsulatum* (*seta*) na forma de levedura dentro do neutrófilo (**A**) (2.000×). *Histoplasma capsulatum* na forma de levedura dentro do monócito (**B**) (2.000×)

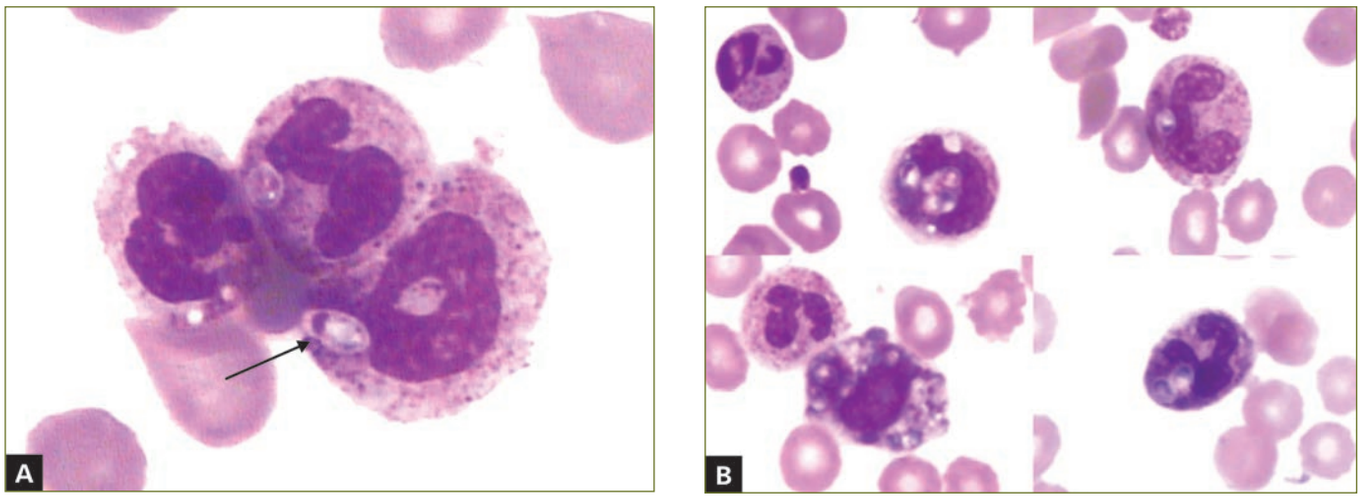


Figura 4.76 (**A** e **B**) *Histoplasma capsulatum* (*seta*) na forma de levedura dentro do neutrófilo (**A**) (2.000×). *Histoplasma capsulatum* na forma de levedura dentro dos fagócitos (**B**)

distribuição seja pan-étnica, tem sido descrito um aumento na prevalência no Brasil, nas Ilhas Maltese e em Roma, na Itália.

As manifestações clínicas mais frequentes da GM1 são: regressão psicomotora, dismorfia facial, hepatoesplenomegalia, anomalias ósseas, mancha vermelho-cereja no fundo do olho e deteriorização neurológica grave e evolutiva.

A GM1 pode ser classificada em três tipos: forma infantil (ou tipo 1), forma juvenil (ou tipo 2) e forma adulta (ou tipo 3), conforme a data da instalação da doença:

- A forma infantil apresenta graves sintomas durante os primeiros meses de vida e, geralmente, morte por broncopneumonia antes dos 2 anos de idade.
- Na forma juvenil, a instalação da doença é mais demorada e apresenta evolução lenta dos sintomas, mas a progressiva deteriorização neurológica e as infecções respiratórias levam à morte antes dos 10 anos de idade.
- A forma adulta começa geralmente a apresentar alterações neurológicas na adolescência, e a evolução da doença é muito lenta.

No momento, somente a terapia de suporte sintomatológico está disponível para o tratamento dos pacientes com GM1, porém alguns procedimentos são utilizados como tratamento da doença, como o transplante de medula óssea, a terapia de redução do substrato e a terapia gênica. No sangue periférico dos pacientes portadores de GM1, observam-se linfócitos com grandes e diversas inclusões "como-vacúolos" associados a eosinófilos anômalos, formando um quadro citomorfológico característico da doença (Figuras 4.77 a 4.79).

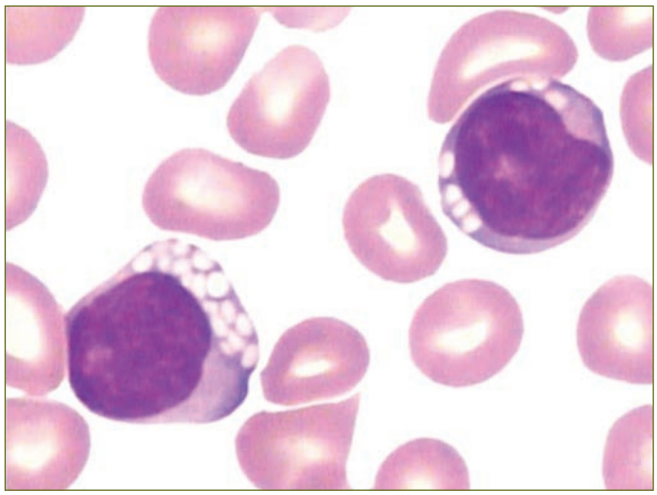


Figura 4.77 Gangliosidose: linfócitos com inclusão de esfingolipídios semelhantes a vacúolos (2.000×)

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO II: LINFÓCITO COM PEQUENAS INCLUSÕES VIOLETA PERIFÉRICAS

A mucopolissacaridose (MPS) tipo II, ou síndrome de Hunter, é provocada pela deficiência ou pela ausência da enzima iduronato-2-sulfatase, em razão de um grave distúrbio genético que acomete principalmente os homens. Na síndrome de Hunter, os glicosaminoglicanos (GAG) dermatan sulfato e heparan sulfato acumulam-se no corpo e produzem uma série de graves sintomas no paciente.

Geralmente, o diagnóstico é estabelecido entre 2 e 4 anos de idade, com sinais e sintomas visíveis (características faciais típicas, macrocefalia e aumento de abdome). Realiza-se o diagnóstico definitivo da síndrome de Hunter dosando a atividade da enzima iduronato-2-sulfatase no soro, em leucócitos ou em fibroblastos obtidos por biopsia da pele.

No sangue periférico dos pacientes com síndrome de Hunter, são observadas em alguns linfócitos pequenas inclusões violeta periféricas, características desse subtipo de mucopolissacaridose (Figura 4.80). Tais inclusões podem sugerir uma investigação diagnóstica para a síndrome de Hunter.

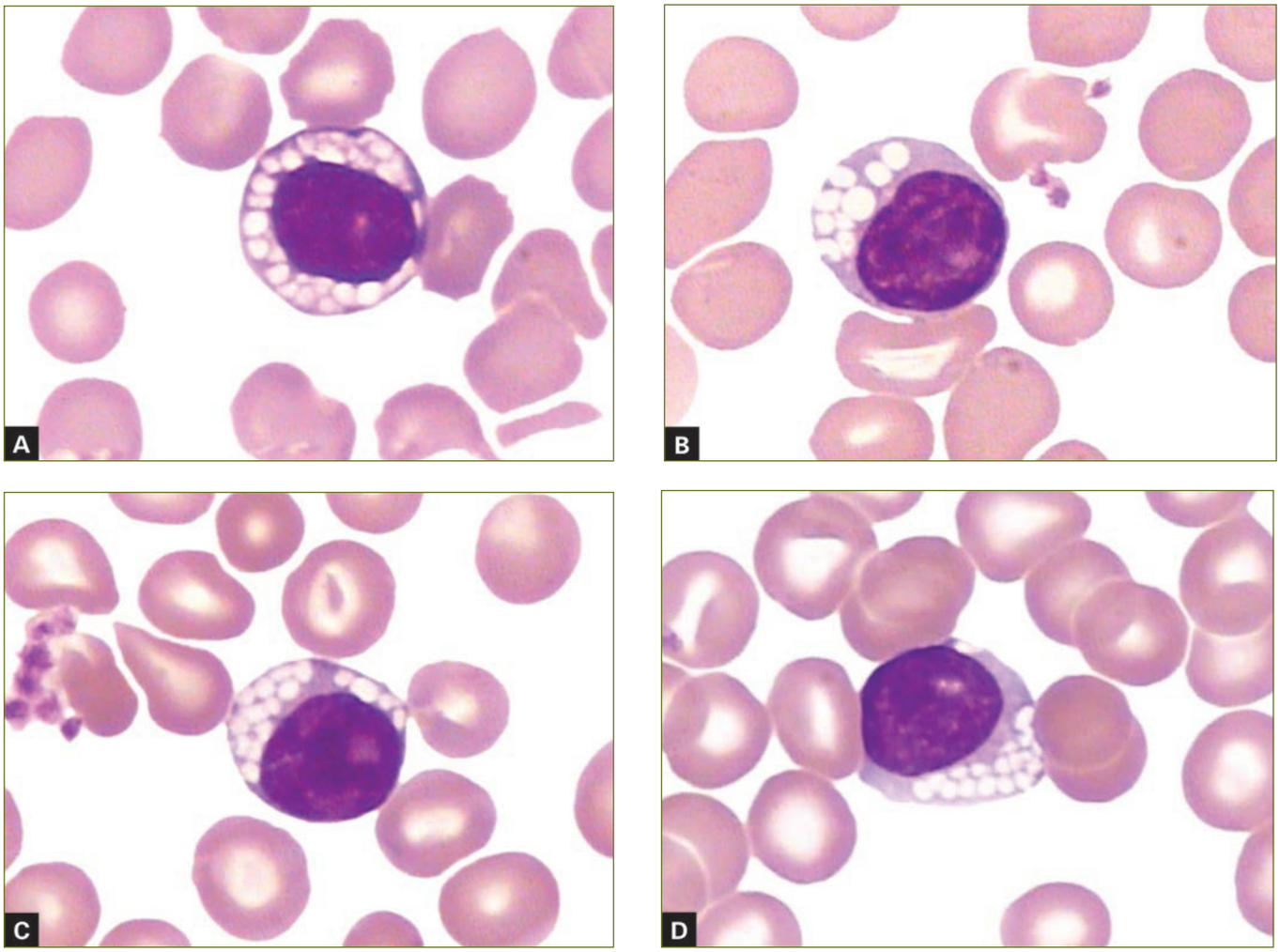


Figura 4.78 (**A** a **D**) Gangliosidose: linfócitos com inclusão de esfingolipídios semelhantes a vacúolos (2.000×)

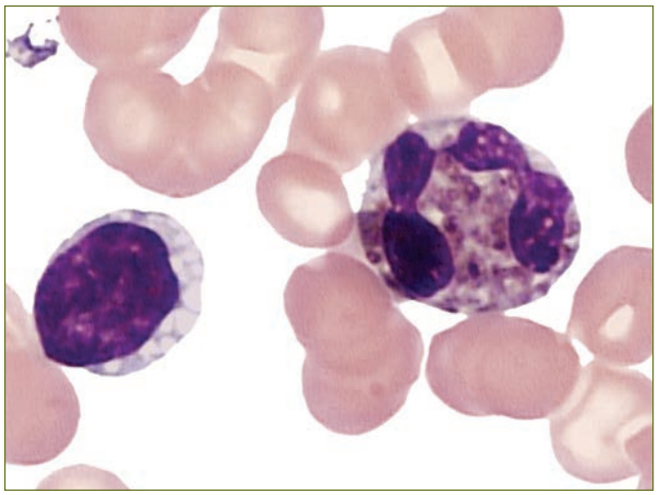


Figura 4.79 Gangliosidose: linfócito com inclusão de esfingolipídio e eosinófilo anômalo (2.000×)

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO III: LINFÓCITO COM INCLUSÃO GIGANTE VIOLETA PERIFÉRICA

Esta nova inclusão, denominada "linfócito com inclusão gigante violeta periférica", foi observada apenas em pacientes portadores de MPS tipo III (síndrome de Sanfilippo) e tipo II (síndrome de Hunter) representa o depósito do GAG sulfato de heparan no citoplasma dos linfócitos. Tais tipos de MPS apresentam inclusões apenas nos linfócitos.

Recentemente descoberto,* o "linfócito com inclusão gigante violeta periférica" está sendo utilizado como biomarcador na pesquisa de desenvolvimento da nova enzima para tratamento da MPS tipo III e no acompanhamento de resultados no tratamento da MPS tipo II. No sangue periférico, esta inclusão apresenta-se como uma imensa massa de coloração violeta, geralmente localizada na periferia do linfócito. Entretanto, foram raramente observadas algumas formas – como um agrupamento de pequenas inclusões (Figuras 4.81 e 4.82). A percentagem dessas células variou entre 10% e 30% dos linfócitos contados, entre os pacientes pesquisados.

*Pesquisa realizada pelo autor e sua equipe em pacientes portadores de MPS tipos II e III.

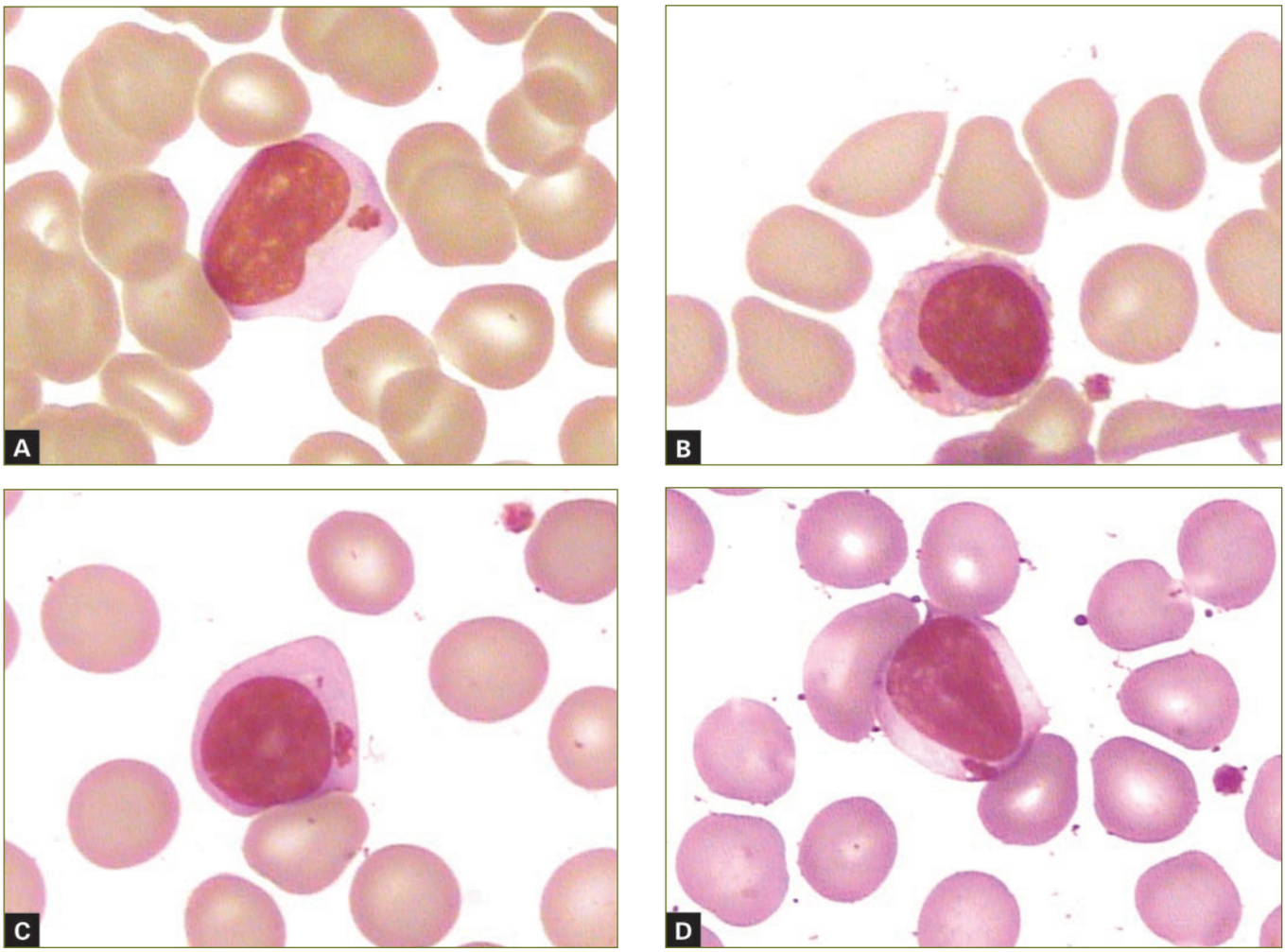


Figura 4.80 (**A** a **D**) Síndrome de Hunter: linfócito com pequenas inclusões violeta periféricas (2.000×)

Figura 4.81 Linfócito com inclusão gigante violeta periférica (2.000×)

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV: NEUTRÓFILO COM GRANDES E ESCASSAS GRANULAÇÕES

A MPS tipo IV, ou síndrome de Morquio, é causada pela deficiência ou pela ausência das enzimas N-acetilgalactosamina-6--sulfatase ou betagalactosidase, acumulando o GAG queratan sulfato nos pacientes portadores. Este subtipo de mucopolissacaridose existe em duas formas, MPS tipo IVA e MPS tipo IVB. A MPS IVB é mais rara que a MPS IVA e esta apresenta uma displasia espôndilo-epífiso-metafisária geralmente diagnosticada durante o segundo ano de vida. Nesse tipo de MPS, o maior comprometimento é ósseo e, em geral, a inteligência é normal. Deformidades esqueléticas tornam-se mais evidentes quando a criança cresce. A terapia enzimática recombinante para os pacientes portadores da síndrome de Morquio foi aprovada recentemente pelos órgãos internacionais, e o prognóstico dos pacientes depende da gravidade da doença.

No sangue periférico dos pacientes portadores da síndrome de Morquio, observam-se grandes e escassas granulações em vários neutrófilos (Figura 4.83). Nos dois primeiros anos de vida, a presença dessas inclusões nos neutrófilos pode ser a única e importante indicação para confirmar o diagnóstico da doença.

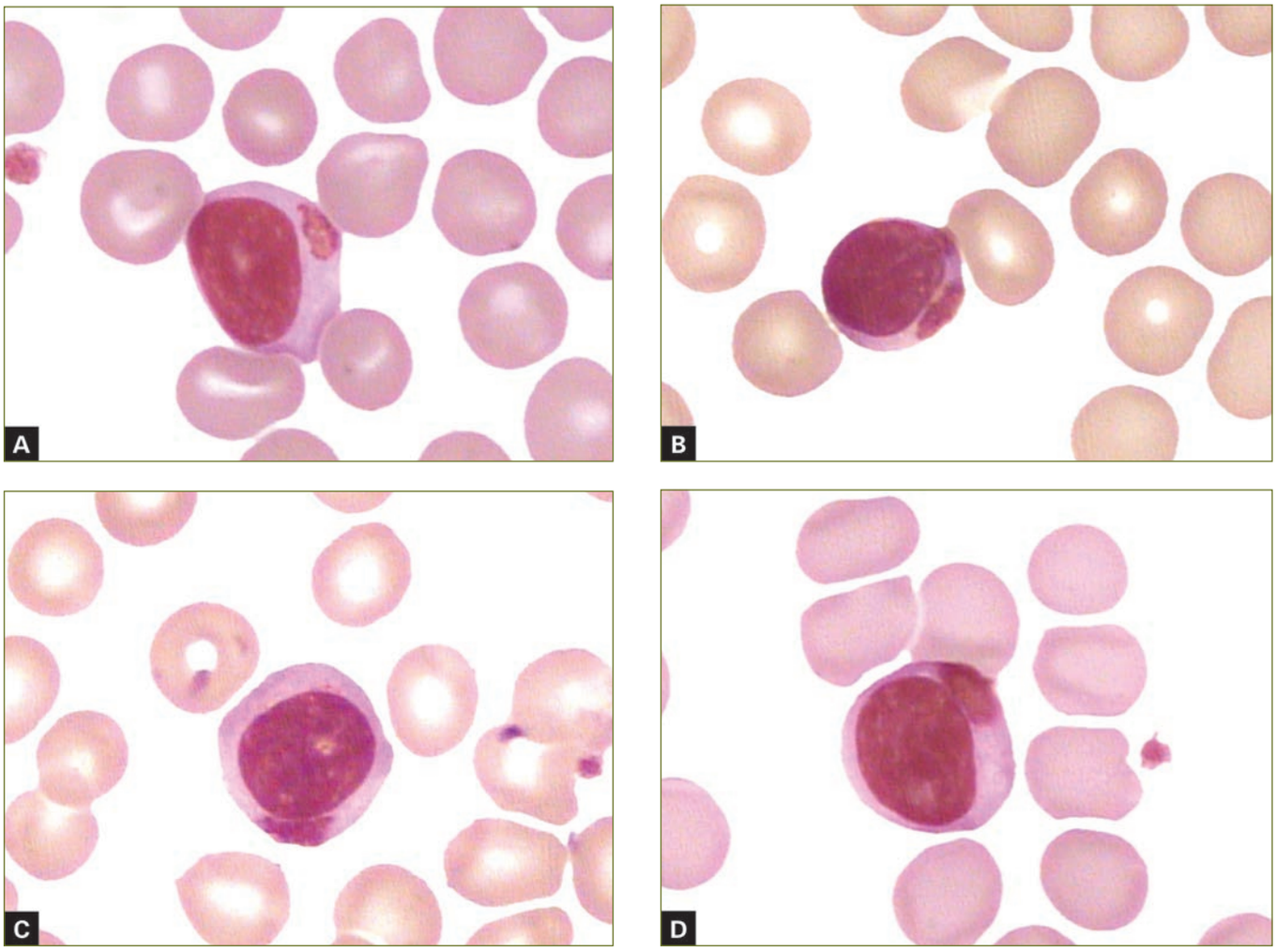


Figura 4.82 (**A** a **D**) Linfócitos com inclusões gigantes violeta periféricas (2.000×)

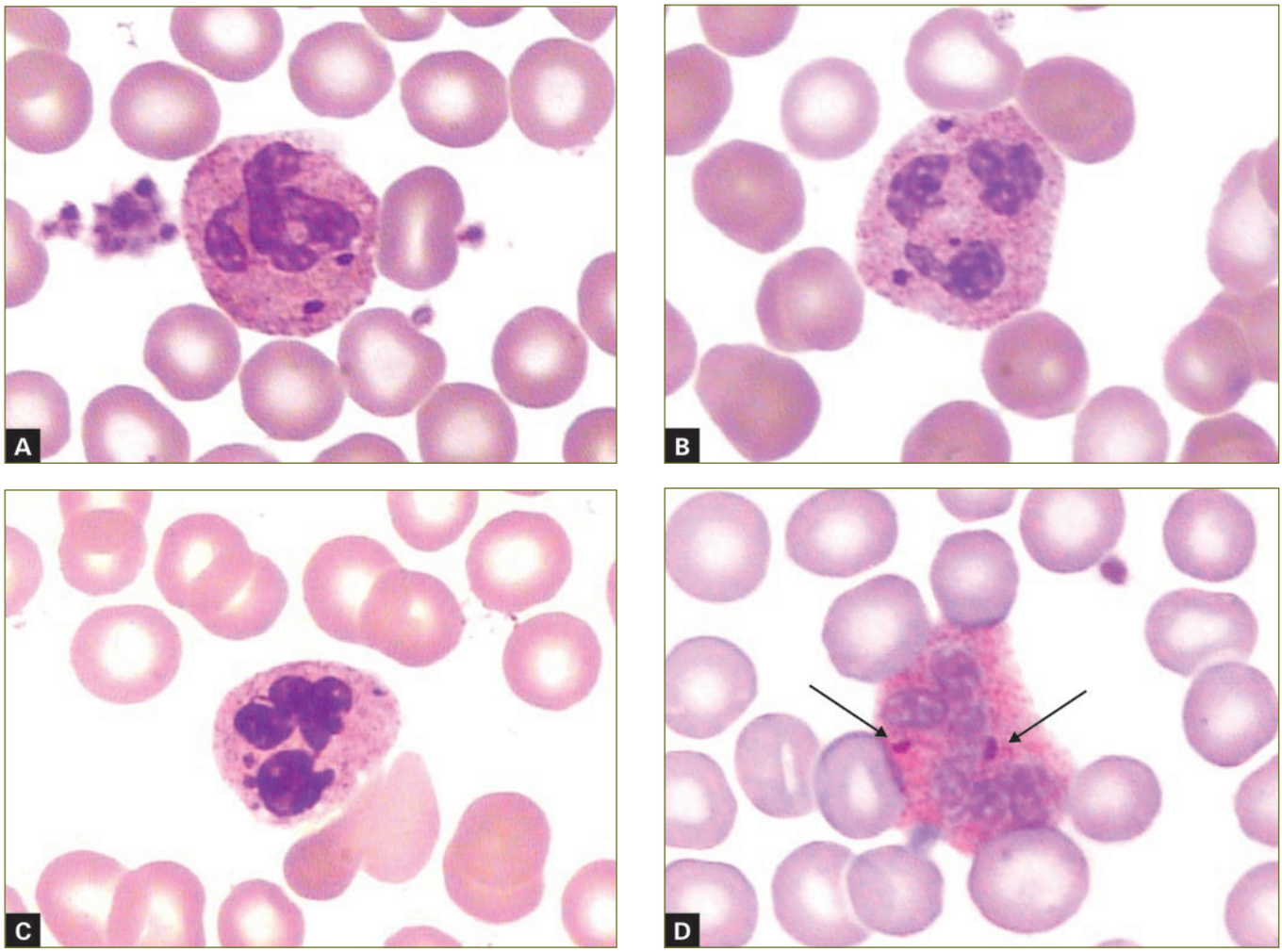


Figura 4.83 (**A** a **D**) Síndrome de Morquio: neutrófilos com grandes e escassas granulações. Coloração especial de envelhecimento com destaque para as granulações típicas da doença (*setas*) (2.000×)

MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO VI: ANOMALIA DE ALDER-REILLY – CÉLULA DE GASSER

A MPS é uma doença autossômica recessiva, do grupo das doenças de depósitos lisossômicos. Seus portadores apresentam diminuição ou falta na produção das enzimas responsáveis pela metabolização dos GAG, anteriormente conhecidas como mucopolissacarídeos. Isso resulta em um evidente acúmulo desses carboidratos nos lisossomos das células.

A MPS é dividida em sete tipos e 11 subtipos no total, porém a anomalia de Alder-Reilly é apenas encontrada na mucopolissacaridose tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), que provoca a deficiência da enzima arilsulfatase-B e o acúmulo da GAG dermatan sulfato.

A anomalia de Alder-Reilly provoca depósitos em todos os leucócitos. Em alguns neutrófilos, o acúmulo de GAG pode apresentar-se acentuado com semelhança morfológica aos promielócitos LMA M3.

Os eosinófilos e basófilos apresentam características tintoriais anormais, demonstrando dois tipos de grânulos no citoplasma da célula. Os contadores hematológicos não conseguem contar essas células, devido à alteração na dispersão celular (método de identificação celular eletrônico) (Figuras 4.84 a 4.89).

A célula de Gasser é uma célula patognômonica da MPS tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy). É um linfócito que apresenta pequenas inclusões citoplasmáticas densas em formato de ponto ou vírgula circundada por espaços claros, representando o depósito do acúmulo da GAG dermatan sulfato.

Em 1965, essa célula foi observada apenas em pacientes com a MPS tipo VI e citada em algumas publicações científicas. Entretanto, em pesquisa atual com a célula de Gasser* (linfócito com inclusão metacromática circundada por espaços claros), comprovou-se sua função como biomarcador da MPS tipo VI, após o desaparecimento desta célula durante a terapia de reposição enzimática, confirmando a eficácia do tratamento. Os pacientes portadores da MPS tipo VI ainda sem tratamento de reposição enzimática apresentam uma contagem no sangue periférico, em média, de 15% de células de Gasser, entre os linfócitos.

*Pesquisa realizada pelo autor e sua equipe em pacientes portadores de MPS tipo VI.

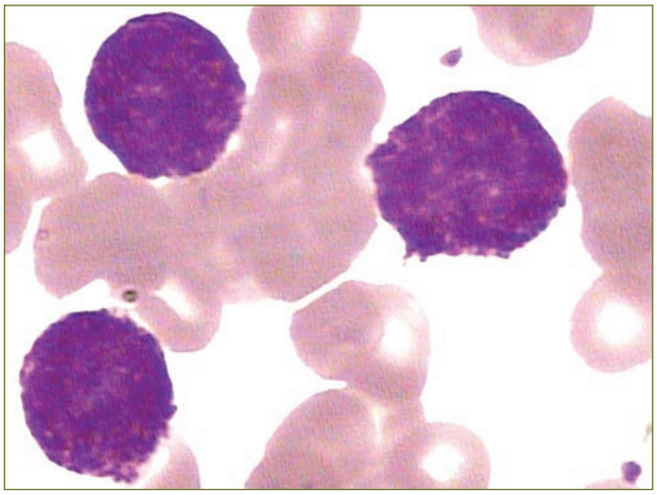


Figura 4.84 Anomalia de Alder-Reilly: neutrófilos com intenso depósito de GAG (2.000×)

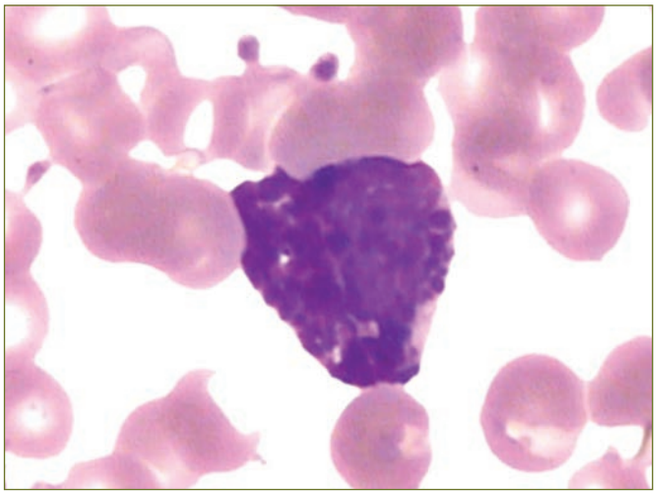


Figura 4.87 Anomalia de Alder-Reilly: basófilo com depósito de GAG (2.000×)

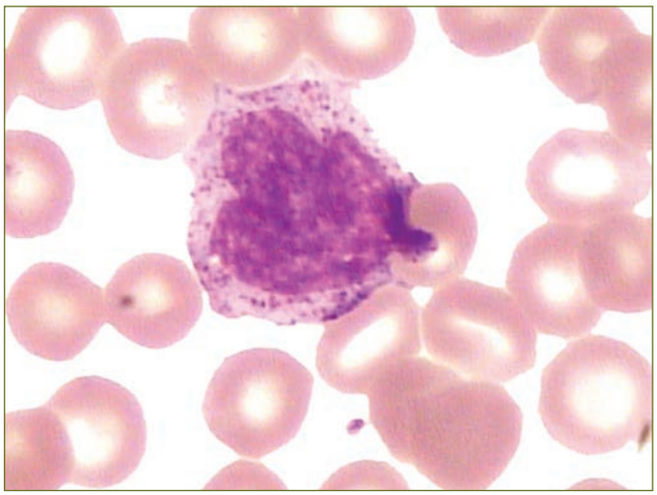


Figura 4.85 Anomalia de Alder-Reilly: monócito com depósito de GAG (2.000×)

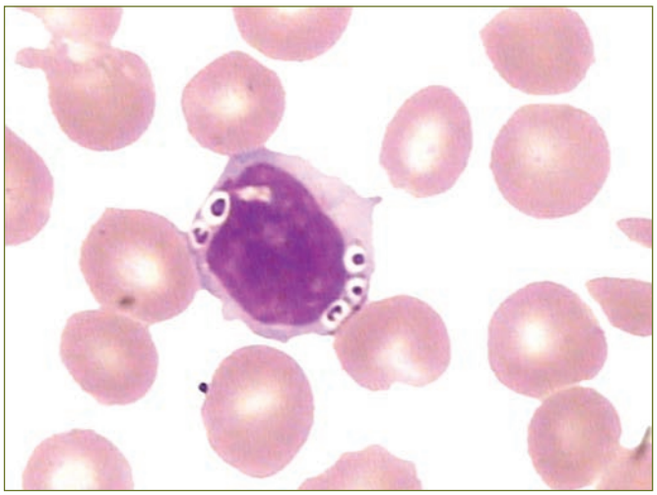


Figura 4.88 Linfócito com inclusão metacromática circundada por espaços claros: célula de Gasser (2.000×)

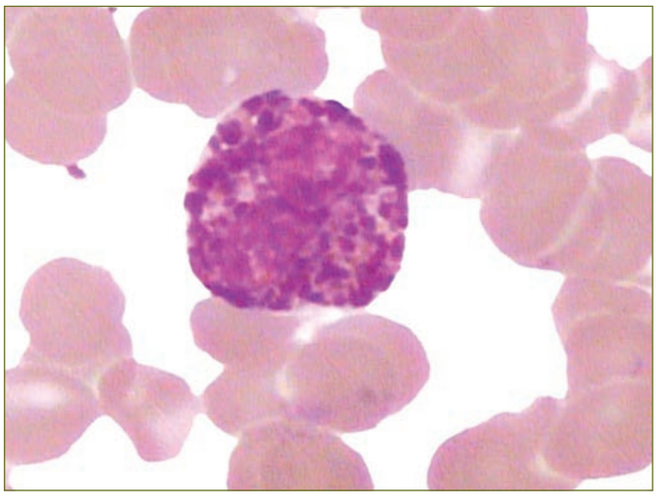


Figura 4.86 Anomalia de Alder-Reilly: eosinófilo apresentando dois tipos de grânulos no citoplasma (2.000×)

ATIPIAS LINFOCITÁRIAS CAUSADAS POR DOENÇAS INFECCIOSAS

MONONUCLEOSE INFECCIOSA

A mononucleose infecciosa é uma síndrome infectocontagiosa benigna que costuma ser causada pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e ocorre principalmente no fim da adolescência ou em adultos jovens. O EBV é transmitido por meio do contato humano íntimo, frequentemente com a saliva durante o beijo. É uma doença de baixa mortalidade, com grande variação clínica para o diagnóstico. Na maioria dos pacientes, a mononucleose cursa de 4 a 6 semanas.

Geralmente, a mononucleose apresenta-se com febre e dor de garganta. Além disso, os linfonodos costumam ser distintos e aumentados por todo o corpo, principalmente na região cervical, nas axilas e nas regiões da virilha. O baço está aumentado na maioria dos casos, e a função hepática é quase sempre

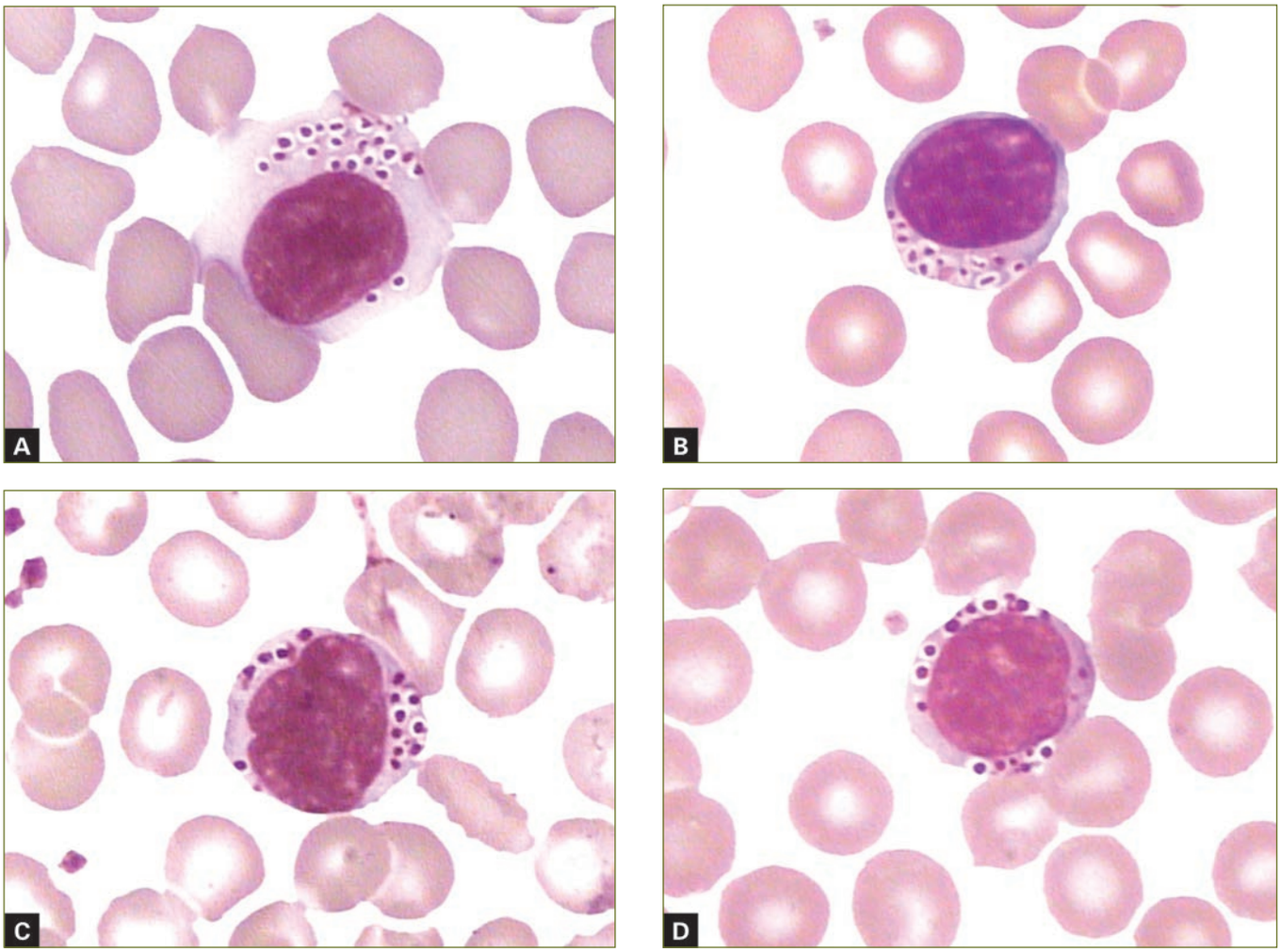


Figura 4.89 (**A** a **D**) Linfócitos com inclusões metacromáticas circundadas por espaços claros: células de Gasser (2.000×)

deficiente de modo transitório em algum grau, ainda que a hepatomegalia seja moderada.

Os sintomas da mononucleose aparecem sob a iniciação da resposta imune do paciente. A imunidade celular mediada pelas células citotóxicas CD8 e linfócitos NK é o componente mais importante dessa resposta. Os linfócitos atípicos vistos no sangue, característicos dessa doença, são as células citotóxicas CD8, mas também contemplam os NK. A proliferação reativa das células T é amplamente centrada nos tecidos linfoides, que são os responsáveis pela linfadenopatia e pela esplenomegalia.

No sangue periférico, ocorre linfocitose absoluta com uma contagem total de leucócitos entre 12.000 e 18.000 células/μL, sendo mais de 60% de linfócitos. Destes últimos, cerca de 20% a 60% são linfócitos atípicos grandes com 12 a 16μm de diâmetro, caracterizados por citoplasma abundante, com aumento da basofilia e do contorno citoplasmático, além de polimorfismo nuclear (Figuras 4.90 e 4.91). Em geral, esses linfócitos

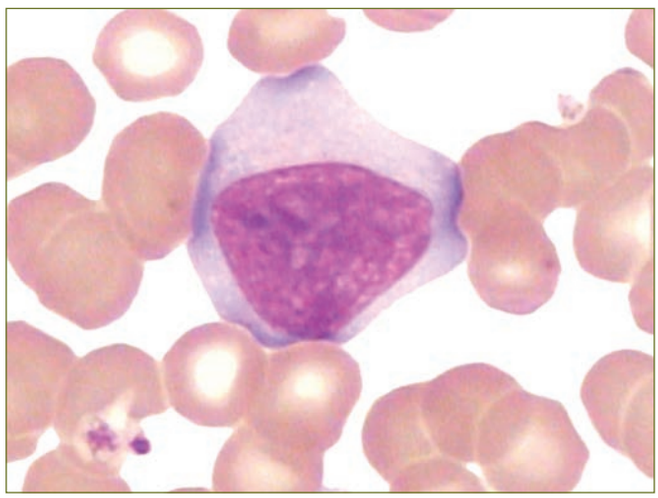


Figura 4.90 Mononucleose: linfócito atípico por hiperbasofilia citoplasmática e polimorfismo nuclear (2.000×)

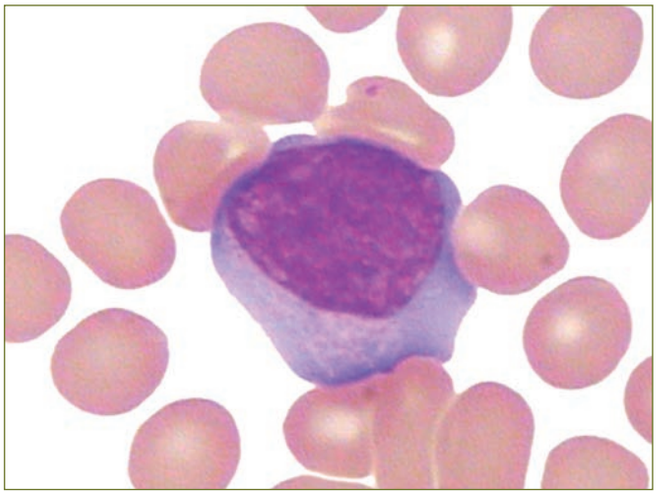


Figura 4.91 Mononucleose: linfócito atípico por hiperbasofilia citoplasmática e polimorfismo nuclear (2.000×)

atípicos, a maioria dos quais expressa CD8, são suficientemente distintos para possibilitar o diagnóstico do exame de um esfregaço sanguíneo periférico, assim como para a reação positiva de anticorpos heterófilos e anticorpos específicos para os antígenos do EBV (antígenos capsídios virais, antígenos precoces ou antígeno nuclear do EBV).

Existem várias doenças que podem levar a um quadro clínico e laboratorial indistinguível da mononucleose infecciosa clássica produzida pelo vírus EBV. Diante da síndrome da mononucleose infecciosa, a negatividade da reação de Paul-Bunnell determina o aparecimento de uma nova síndrome, denominada mononucleose infecciosa "símile" ou mononucleose "*like*", que pode ser produzida por inúmeros agentes etiológicos, tais como citomegalovírus e *Toxoplasma gondii*, além dos vírus da rubéola, da papeira e da influenza A e B, entre outros.

DENGUE

A dengue é uma doença viral aguda causada pelo arbovírus da família Flaviridae. Considerada a mais importante arbovirose já descrita, acomete mais de 50 milhões de pessoas por ano no mundo, apresentando um grande potencial endemoepidêmico em praticamente todos os continentes. A doença é transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* infectado pelo vírus da dengue.

Geralmente, a doença manifesta-se de duas formas: a benigna (ou clássica) e a grave (ou hemorrágica). No entanto, a maioria dos casos é da forma clássica.

No Brasil, a dengue é conhecida desde os tempos de colônia, e o *Aedes aegypti* teve origem na África e chegou ao Brasil nos depósitos de água dos navios negreiros. As manifestações clínicas mais comuns da doença são: dor de cabeça, dores musculares, dor atrás dos olhos, dores nas juntas, prostração e febre alta.

Classifica-se a dengue em quatro tipos imunológicos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A infecção por um deles oferece proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária para os outros três tipos.

Como essa é uma doença viral ainda sem tratamento específico e ainda sem vacina, atualmente o único método disponível para a prevenção da doença é o controle do *Aedes aegypti*. O hábitat do mosquito é o ambiente doméstico. Por esse motivo, a atuação dos serviços de saúde e da participação da população exerce papel fundamental no controle da doença.

No sangue periférico dos pacientes com dengue clássica, observam-se evidente leucopenia, plaquetopenia variável e pequenos linfócitos atípicos por hiperbasofilia citoplasmática (Figuras 4.92 e 4.93). Na dengue hemorrágica, além das manifestações citadas, ocorre também hemoconcentração, com aumento do hematócrito e plaquetopenia acentuada.

HIV/AIDS

A AIDS foi a primeira abreviatura da literatura científica da síndrome da imunodeficiência adquirida, também descrita em português como SIDA. A AIDS é o estágio final da infecção

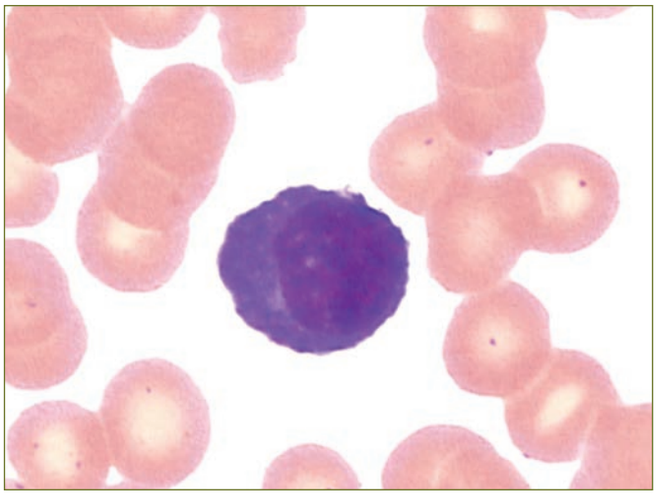


Figura 4.92 Dengue: linfócito atípico por hiperbasofilia citoplasmática (2.000×)

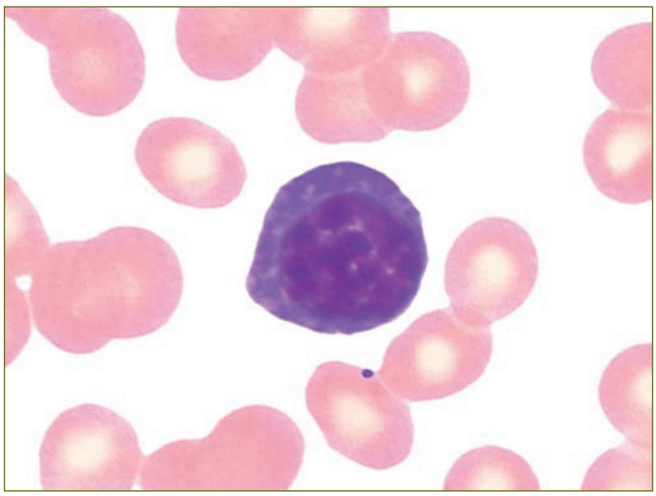


Figura 4.93 Dengue: linfócito atípico por hiperbasofilia citoplasmática (2.000×)

causada pelo retrovírus HIV, transmitido pelas vias sexuais, parenteral e vertical. A síndrome caracteriza-se pela profunda imunodeficiência que resulta em infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas.

Duas formas de HIV geneticamente diferentes foram isoladas em pacientes com AIDS. A primeira foi chamada de HIV-1, o tipo mais comum associado à AIDS em todas as Américas e na Europa, enquanto o HIV-2 é mais frequente na África Ocidental e na Índia. Embora distintos, o HIV-1 e o HIV-2 compartilham alguns antígenos semelhantes.

A terapia antirretroviral combinada (TARV) com a inclusão dos inibidores da protease (IP) proporcionou, a partir de 1996, menor morbidade e mortalidade aos portadores da doença, pela supressão sustentada da carga viral e pela restauração da resposta imunológica. A introdução da TARV e dos IP diminui a replicação do HIV e, consequentemente, baixa o RNA viral no plasma para níveis indetectáveis.

Com o aumento da sobrevida dos indivíduos com AIDS, ocorreu a instalação de outras comorbidades, que podem apresentar impacto na qualidade de vida dos pacientes. Entre elas, destacam-se a síndrome lipodistrófica, que é a redistribuição da gordura pelo corpo, e também as alterações metabólicas, as quais têm como consequência o risco aumentado para doenças cardiovasculares. No sangue periférico, os pacientes portadores de AIDS ainda sem a TARV podem apresentar linfócitos com polimorfismo nuclear (Figuras 4.94 e 4.95).

HEPATITE VIRAL

A hepatite viral é o termo designado para a infecção causada por um grupo de vírus que tem afinidade pelo fígado. Os vírus hepatotrópicos causam formas de hepatite diferentes, porém podem apresentar padrões superpostos. Esse grupo é dividido em seis tipos de hepatites (A, B, C, D, E e G) e cada uma tem características peculiares.

A hepatite tipo A é uma doença autolimitada benigna que apresenta um período de incubação de 2 a 6 semanas. O vírus

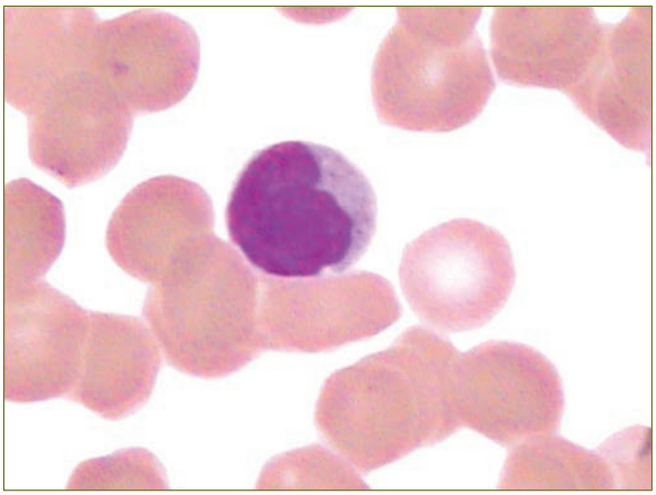


Figura 4.94 AIDS: linfócitos com discreto polimorfismo nuclear (2.000×)

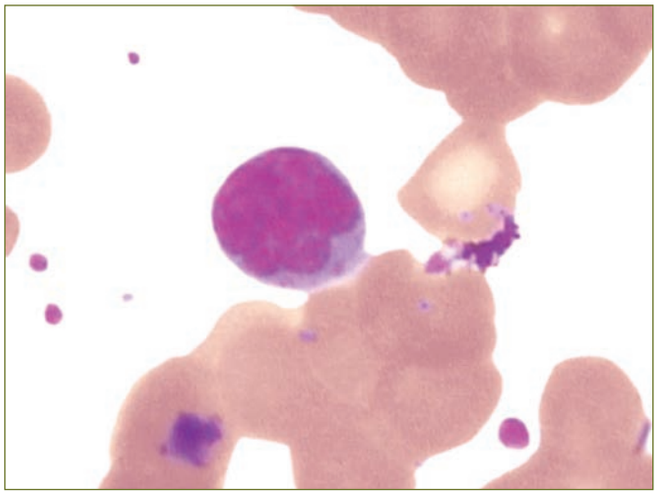


Figura 4.95 AIDS: linfócitos com polimorfismo nuclear (2.000×)

da hepatite A (VHA) não causa hepatite crônica nem estado de portador e, raramente, leva à hepatite fulminante. Entretanto, a infecção por hepatite A pode ser mais grave se ela for superposta à hepatite crônica pelo vírus da hepatite B (VHB) e pelo vírus da hepatite C (VHC). A hepatite A ocorre em todo o mundo e é endêmica em países com higiene e saneamento abaixo dos padrões. O diagnóstico sorológico tem como marcador confiável os anticorpos específicos contra o VHA do tipo imunoglobulinas IgM, que aparecem no sangue no início dos sintomas da doença. A transmissão é feita por via fecal-oral.

O VHB pode desenvolver quadros clínicos diferentes, como hepatite aguda, hepatite crônica que pode evoluir para cirrose, hepatite fulminante com necrose maciça do fígado ou servir de "pano de fundo" para a instalação da hepatite D. O VHB tem um período de incubação prolongado de 4 a 26 semanas. A transmissão da hepatite B se dá por vias parenteral e sexual. O diagnóstico sorológico da hepatite B consiste em vários testes sorológicos de acordo com a fase da doença. Um exemplo é o HBsAg, que aparece antes do início dos sintomas, chega ao máximo durante a doença fraca e depois declina para níveis indetectáveis em 3 a 6 meses. Também se utiliza o anti-HBe, detectável logo que a infecção aguda está regredindo.

A hepatite C é uma evidente causa de doença do fígado em todo o mundo, e 70% dos pacientes apresentam infecção crônica determinada pela presença de DNA viral no soro. O período de incubação da hepatite C varia de 2 a 26 semanas, com média entre 6 e 12 semanas. O VHC é detectável no sangue durante 1 a 3 semanas após o contato, coincidindo com as elevações das transaminases séricas. É transmitida por transfusão sanguínea e relações sexuais.

Na hepatite D, o vírus é um RNA único que tem deficiência na replicação, causando infecção apenas quando está encapsulado pelo HBsAg. Assim, depende da informação genética provinda do HCV, provocando hepatite apenas quando há VHC.

Na hepatite E, o vírus tem um período de incubação de 2 a 8 semanas e com transmissão transportada pela água, entericamente transmitida. Ocorre principalmente em adultos jovens, sendo rara em crianças.

Na hepatite G, a transmissão ocorre pelo sangue e é comum em receptores de transfusão e usuários de drogas ilícitas intravenosas. O vírus é frequentemente encontrado em associação a outros vírus, como os das hepatites C e B ou o da AIDS.

Na análise morfológica do sangue periférico na hepatite viral na forma aguda, observam-se evidente linfocitose com linfócitos atípicos por aumento da basofilia citoplasmática e geralmente um evidente aumento no tamanho do linfócito atípico (Figuras 4.96 e 4.97).

COQUELUCHE

A coqueluche é uma doença infecciosa aguda e altamente comunicável, causada pela bactéria Gram-negativa *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*). Caracteriza-se por paroxismos de tosse violenta acompanhada por um "estridor" inspiratório alto, que mata centenas de milhares de crianças no mundo a cada ano.

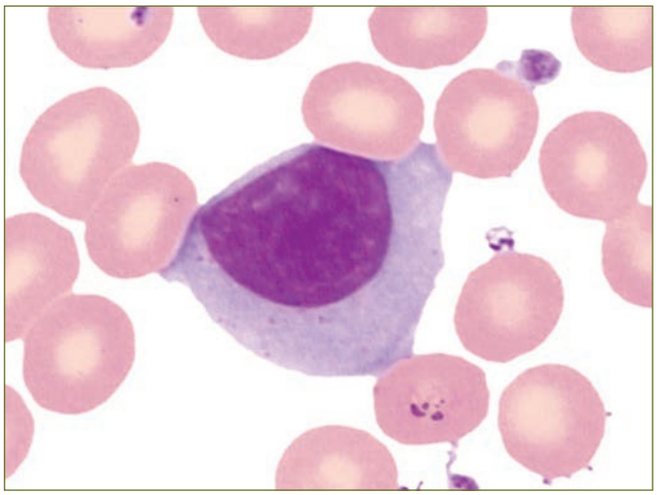


Figura 4.96 Hepatite: linfócito atípico por aumento da basofilia citoplasmática e polimorfismo (2.000×)

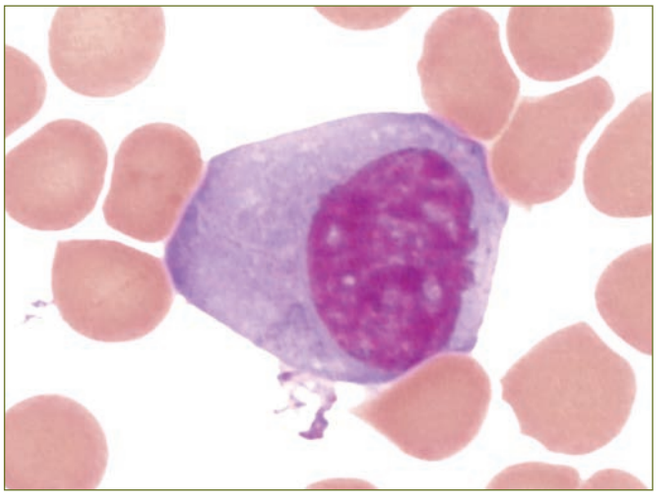


Figura 4.97 Hepatite: linfócito atípico por aumento da basofilia citoplasmática e polimorfismo (2.000×)

A doença foi descrita pela primeira vez em 1578, mas a *B. pertussis* foi apenas isolada em 1907 pelos franceses Jules Bordet e Octave Gengou. Já a vacina para a coqueluche foi desenvolvida em 1926.

Além de atingir as crianças ainda não completamente imunizadas (menores de 6 meses), a coqueluche afeta também as vacinadas maiores de 4 anos de idade, adolescentes e adultos, os quais perderam a imunidade adquirida por meio da vacina, na ausência de reforços vacinais. No Brasil, as crianças menores de 1 ano são as mais acometidas pela doença; em seguida, estão as de 1 a 4 anos; e, por último, as crianças de 5 a 9 anos. Os adultos correspondem a apenas 2% a 3% dos casos.

A fonte de infeccção da *B. pertussis*, quase sempre, tem sido atribuída aos familiares da criança, frequentemente pais ou irmãos. Assim como em outros países, no Brasil tem sido demonstrada a positividade da cultura para *B. pertussis* ou reação de cadeia da polimerase (PCR) em familiares de crianças com diagnóstico comprovado.

A *B. pertussis* é transmitida pela inalação de gotas expulsas pela tosse de uma pessoa contaminada. A bactéria coloniza a borda ciliada do epitélio brônquico e invade os macrófagos. As toxinas produzidas pela *B. pertussis* paralisam os cílios, debilitando uma importante defesa do pulmão.

A realização de exames laboratoriais é importante para a confirmação da doença causada pela *B. pertussis.* Essa afirmação é respaldada pela dificuldade no diagnóstico clínico, que ocorre com relativa frequência nas manifestações atípicas da doença. Isso acontece, principalmente, quando a doença acomete lactentes com idade inferior a 6 meses, adolescentes e adultos. O Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA preconiza a realização da cultura e do PCR para o diagnóstico da coqueluche até a terceira semana do início da tosse ou até a quarta semana do início dos sintomas. O teste de PCR tem a vantagem de ser mais sensível que a cultura e detectar pequenas quantidades do microorganismo. A pesquisa de anticorpos é útil sobretudo quando a suspeita diagnóstica é feita tardiamente. A técnica mais utilizada é o ELISA (pesquisa de anticorpos IgG por ensaio imunoenzimático).

O período de incubação é de, aproximadamente, duas semanas e os primeiros sintomas são de um resfriado, com espirros e tosse moderada. Após essa fase, estabelece-se um tipo de tosse convulsiva, contínua e dolorosa que dura, em média, três semanas e pode ser seguida de vômito. Frequentemente, há dor na traqueia e nos brônquios.

No sangue periférico, observou-se nos pacientes com coqueluche acentuada leucocitose, geralmente com contagem superior a 50.000 células/mm^3 leucócitos. Os pacientes costumam desenvolver acentuada linfocitose não reativa acima de 90%. A contagem de linfócitos é mais alta durante as primeiras três semanas da doença. A linfocitose ocorre pela liberação transitória dos linfócitos dos órgãos linfoides seguida por inibição da recirculação dos linfócitos do sangue para o fluxo linfático. Assim, a linfocitose deve-se à redistribuição dos linfócitos na circulação periférica sem aumento da linfopoese. Na maioria, os linfócitos são pequenos e maduros, mas por vezes se observou evidente atipia linfocitária pela presença de linfócitos lobulares (Figuras 4.98 e 4.99).

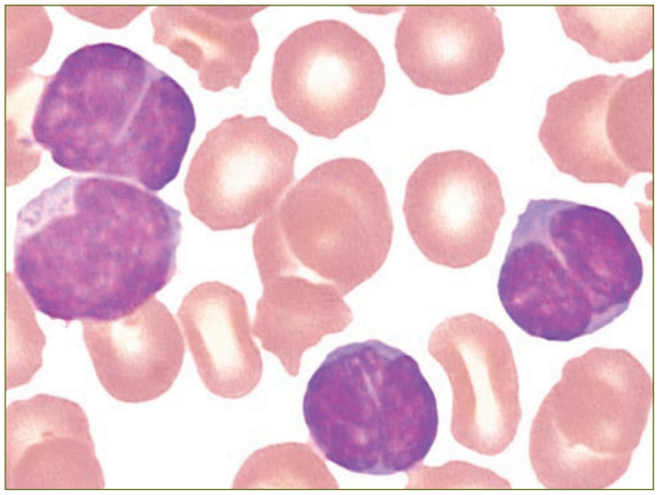


Figura 4.98 Coqueluche: linfócitos atípicos polilobulados (2.000×)

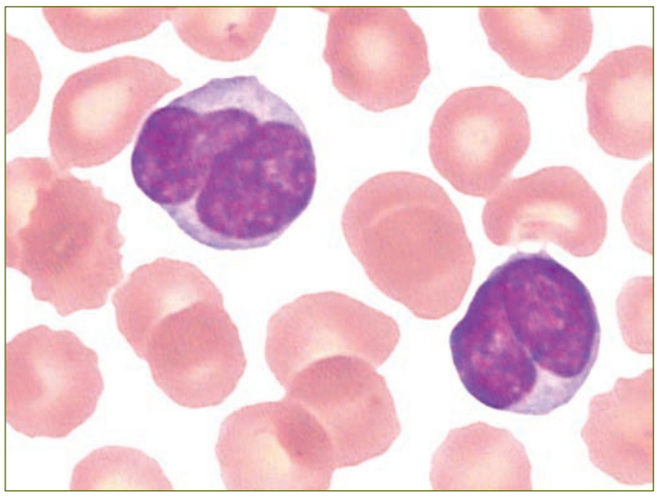


Figura 4.99 Coqueluche: linfócitos atípicos polilobulados (2.000×)

LEUCEMIAS AGUDAS

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda (LMA) caracteriza-se pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide. É uma doença do tecido hematopoético que leva à produção insuficiente de células sanguíneas normais, promovendo um quadro de plaquetopenia, anemia e neutropenia que, em geral, ocorre pelo aumento do número de células blásticas na medula óssea.

Na infância, cerca de 15% a 20% das leucemias agudas são mieloides. Nos adultos, entretanto, essa percentagem sobe para 80%.

As leucemias agudas apresentam um quadro clínico muito diferente das leucemias crônicas. Estas surgem insidiosamente, enquanto as leucemias agudas têm geralmente início súbito.

A seguir, são citadas os 12 subtipos de LMA:

- LMA-M0 (leucemia mieloide aguda – indiferenciada).
- LMA-M1 (leucemia mieloide aguda – mieloblástica).
- LMA-M2 (leucemia mieloide aguda – mieloblástica com maturação).
- LMA-M2v (leucemia mieloide aguda – mieloblástica com maturação variante).
- LMA-M3 (leucemia mieloide aguda – promielocítica hipergranular).
- LMA-M3v (leucemia mieloide aguda – promielocítica hipogranular variante).
- LMA-M4 (leucemia mieloide aguda – mielomonocítica).
- LMA-M4eo (leucemia mieloide aguda – mielomonocítica com eosinofilia).
- LMA-M5a (leucemia mieloide aguda – monoblástica sem maturação).
- LMA-M5b (leucemia mieloide aguda – monoblástica com maturação).
- LMA-M6 (leucemia mieloide aguda – eritroleucemia).
- LMA-M7 (leucemia mieloide aguda – megacarioblástica).

Leucemia mieloide aguda: indiferenciada (LMA-M0)

Esta leucemia é muito rara e também conhecida como LMA com diferenciação mínima, ocorrendo em menos de 5% de todas as LMA. Recentemente descrita, a LMA-M0 caracteriza-se pela infiltração da medula óssea por mais de 20% de células blásticas. A doença pode ocorrer em várias idades, porém é mais frequente em crianças e idosos.

É chamada de indiferenciada por ter um baixo grau de diferenciação, além de somente ser diagnosticada por imunofenotipagem quando se revela, pelo menos, um dos antígenos de linhagem mieloide: CD33, CD13 ou CD11b.

Os blastos da LMA-M0 são comumente confundidos com os blastos da leucemia linfoide aguda (LLA-L2), pois ambos são negativos ao teste citoquímico mieloperoxidase (MPO). Como a terapia da LMA-M0 e da LLA-L2 são diferentes, é muito importante realizar rapidamente a imunofenotipagem. Todavia, os megacarioblastos (LMA-M7) e os blastos bifenotípicos também podem apresentar semelhanças com os blastos da LMA-M0.

Geralmente, os blastos da LMA-M0 apresentam-se pequenos, com cromatina frouxa, nucléolo evidente, citoplasma agranular e sem bastonete de Auer. Entretanto, observam-se frequentemente blastos médios ou pequenos com cromatina mais condensada, nucléolo não aparente e citoplasma escasso, assemelhando-se com os linfoblastos.

Não existe apenas um cromossomo anormal envolvido na LMA-M0. As anormalidades mais frequentes relatadas previamente são de cariótipos complexos, como: –5/del(5q), –7/del(7q), +8 e del(11q).

Os sintomas clínicos mais frequentes na LMA-M0 são: febre, fadiga, perda de peso, perda de apetite, dispneia, dor óssea, hematomas e hemorragias (devido à plaquetopenia), infecções frequentes ou persistentes, esplenomegalia e, raramente, linfadenopatia. Pode surgir um tipo de massa tumoral fora da medula óssea, conhecida como sarcoma granulocítico ou cloroma. É comum alguns pacientes não apresentarem nenhum sintoma, descobrindo a doença em exames de rotina.

No sangue periférico, é muito comum anemia, plaquetopenia e leucometria geralmente elevada. Outras vezes, ele é normal, mas tem blastos (Figuras 4.100 e 4.101).

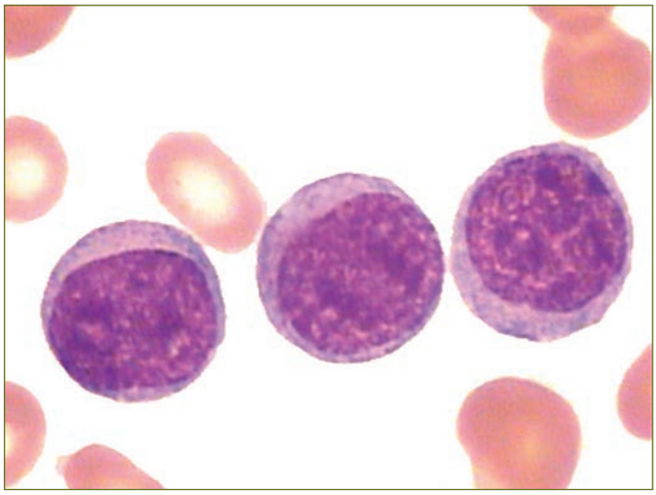


Figura 4.100 LMA-M0: blastos indiferenciados com ausência de grânulos e bastonetes de Auer (2.000×)

No sangue periférico, são comuns anemia, plaquetopenia, leucometria variável com incidência de leucocitose, blastos em geral hipogranúlicos ou agranúlicos com raros bastonetes de Auer e nucléolos bem delimitados, normalmente com citoplasma grande (Figuras 4.102 e 4.104). A LMA-M1 é o tipo de leucemia mais comum nos primeiros meses de vida, embora sua maior incidência seja tipicamente em adultos com média de 46 anos de idade. Nesse subtipo, podem ocorrer também semelhanças morfológicas com a leucemia linfoide aguda (LLA-L2).

Outras células também podem estar presentes na LMA-M1, como promielócitos, geralmente hipogranulares ou agranulares, neutrófilos segmentados em forma de pseudo-Pelger-Huët ou Pelger-Huët adquirido. Na maioria dos casos, os monócitos constituem menos de 1% das células do sangue periférico.

Clinicamente, os sinais e sintomas mais frequentes são febre, fadiga, infecções, episódios de sangramento, hepatomegalia e esplenomegalia. Em alguns casos, observa-se

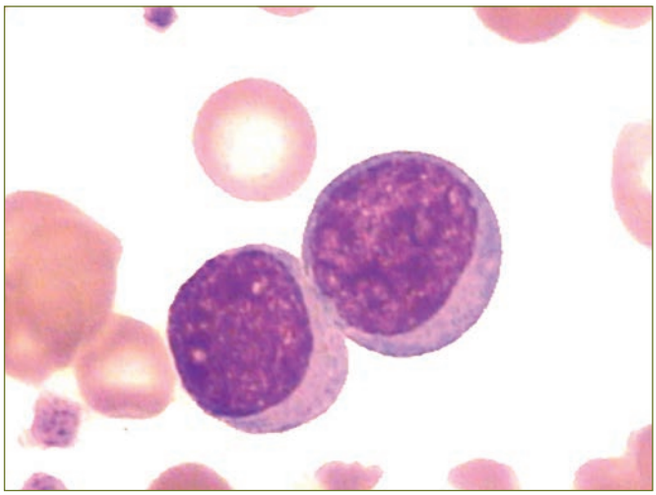


Figura 4.101 LMA-M0: blastos indiferenciados com ausência de grânulos e bastonetes de Auer (2.000×)

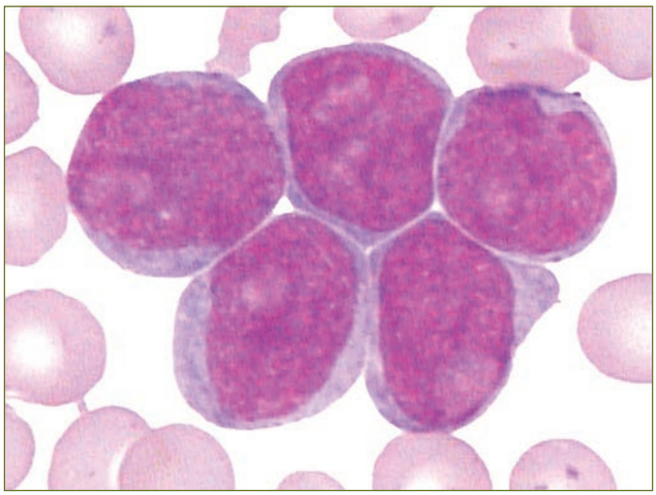


Figura 4.102 LMA-M1: blastos hipogranúlicos, grandes e, na maioria, com citoplasma também grande (2.000×)

Leucemia mieloide aguda: mieloblástica (LMA-M1)

Esta leucemia caracteriza-se pela alta percentagem de blastos na medula óssea, representando 90% das células nucleadas e com maturação inferior a 10%. A citomorfologia e a citoquímica variam nesta leucemia, pois em alguns casos são evidentes as características da linhagem mieloide com blastos contendo granulações, bastonetes de Auer e alta positividade para MPO. Em outros casos, os blastos lembram linfoblastos sem granulação azurófilas, e a positividade para MPO pode estar em apenas poucos blastos. Para a classificação do grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), a positividade para MPO deve ser superior a 3% de blastos.

A imunofenotipagem define a LMA-M1 quando há, pelo menos, três marcadores, entre eles o CD13, o CD33, o CD34, o CD7, o CD4, o CD11b e o HLA-DR. Entre as leucemias mieloides agudas, a LMA-M1 representa 20% dos casos e a clínica desse subtipo de leucemia tem prognóstico razoável.

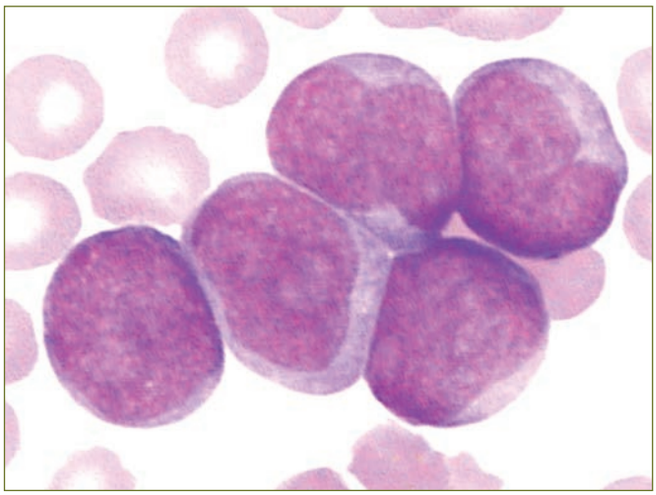


Figura 4.103 LMA-M1: blastos hipogranúlicos (2.000×)

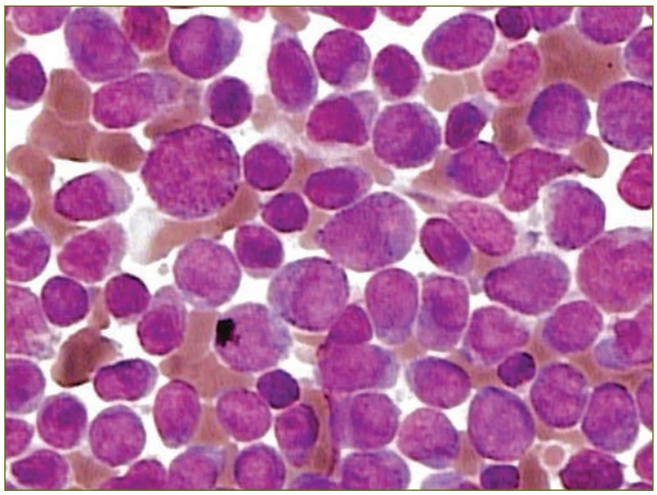


Figura 4.104 LMA-M1: medula óssea (1.200×)

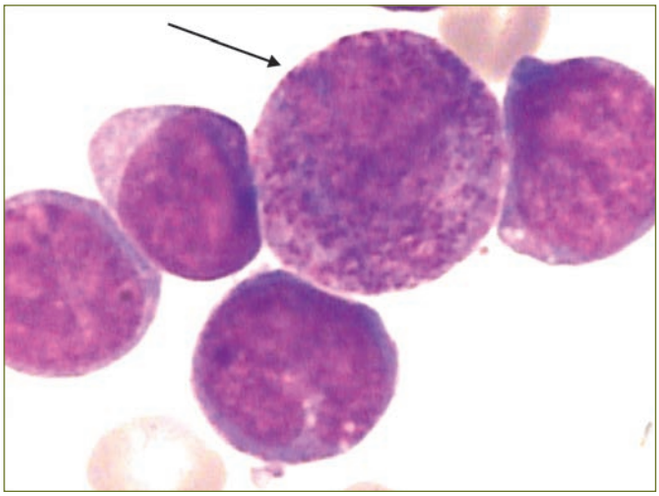


Figura 4.105 LMA-M2 mieloblástica com maturação: quatro blastos e um granulócito (*seta*) (2.000×)

linfadenopatia. A infiltração medular provoca insuficiência celular com hiperviscosidade.

Nesse subtipo de leucemia aguda, pode também ocorrer o surgimento de um tipo de massa tumoral extramedular denominado sarcoma granulocítico, antigamente conhecido como cloroma – nome derivado de sua cor "esverdeada" na expressão de MPO. O sarcoma granulocítico é constituído por mieloblastos ou células mieloides imaturas e pode surgir concomitantemente com a leucemia mieloide aguda ou também em recaídas da doença. Geralmente, a localização do sarcoma granulocítico extramedular ocorre em estruturas ósseas, como crânio, externo, costelas, vértebras, seios paranasais e pelve. Contudo, em alguns casos, é observado em gânglios linfáticos e pele.

Leucemia mieloide aguda: mieloblástica com maturação (LMA-M2)

A LMA-M2 tem incidência maior em crianças e adultos jovens, com idade média de 28 anos, representando 5% a 10% de todos os subtipos de LMA. Na medula óssea, a quantidade de blastos situa-se entre 20% e 90% das células nucleadas, e a percentagem de células monocíticas deve ser menor que 20% das células nucleadas na medula óssea, para que seja diferenciada do subtipo LMA-M4.

A LMA-M2 tem um grau de maturação superior a 10% das células não eritroides. São comuns achados mielodisplásicos do tipo pseudo-Pelger-Huët e pseudo-Chediak-Higashi, além de hipogranulia dos neutrófilos. Na LMA-M2, a positividade para os antígenos mieloides abrange os tipos MPO, CD13, CD33, CDw65 e CD117. A citoquímica tem positividade forte para Sudan Black.

A morfologia das células da LMA-M2 é clássica. Além disso, o mieloblasto apresenta cromatina porosa (um a dois nucléolos) e a relação núcleo-citoplasma é diminuída, com até 20 grânulos azurófilos no citoplasma e com presença ou não de bastonetes de Auer (Figuras 4.105 e 4.106).

Clinicamente, a LMA-M2 pode apresentar infiltrações de células blásticas em ossos, sistema nervoso central, órbitas, pele

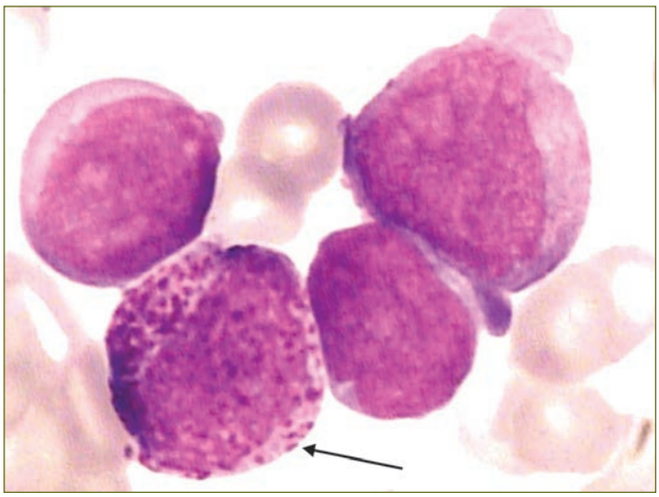


Figura 4.106 LMA-M2 mieloblástica com maturação: três blastos e um granulócito (*seta*) (2.000×)

e gengiva. Em 28% dos casos, observam-se esplenomegalia, manifestações hemorrágicas e epistaxe. A hepatomegalia e a linfadenopatia não são muito frequentes nesse subtipo de leucemia aguda. O sarcoma granulocítico, ou cloroma, também pode ser observado na LMA-M2, mas se localiza especialmente na área da face em 20% dos casos.

Os pacientes portadores de LMA-M2 apresentam elevados índices de remissão completa com tratamento quimioterápico, porém há um grupo de pacientes com granulocitose comumente recidiva que apresenta uma curta sobrevida. Na classificação das LMA, podem ser utilizados quatro tipos de estudos para se chegar ao diagnóstico. A classificação morfológica foi a primeira a ser utilizada e, por vezes, é também a primeira a detectar sinais de início de uma leucemia. Realiza-se a citoquímica por meio de alguns testes, como Sudan Black, MPO e esterase não específica. A imunofenotipagem revela marcadores fenotípicos classificados pela nomenclatura "CD" pelo método

de citometria de fluxo. Por sua vez, a citogenética revela as anormalidades nos genes que regulam o ciclo celular, as quais podem levar à proliferação celular maligna. Assim, no caso da LMA-M2, ocorre uma lesão genética do tipo translocação cromossômica t(8;21).

Leucemia mieloide aguda – mieloblástica com maturação: variante (LMA-M2v)

Este subtipo tem a morfologia diferente da LMA-M2, pois os blastos são grandes e o citoplasma é grande e com granulações azurófilas (há casos em que as granulações são tão grandes que sugerem um pseudo-Chediak-Higashi), além de bastonetes de Auer serem frequentes. São comuns promielócitos, mielócitos e granulócitos maduros com vários graus de displasia e disgranulopoese (segmentação nuclear anormal).

Precursores eosinofílicos são frequentes, mas sem anormalidades citológicas ou citoquímicas como na LMA-M4eo, na qual existe proliferação clonal. Também é comum a pseudo-Pelger-Huët.

A MPO é positiva em mais de 3% dos blastos e o Sudan Black, intensamente positivo. Essa leucemia é mais frequente em pacientes com síndrome de Down, e a clínica cursa com esplenomegalia, anemia, fadiga e episódios hemorrágicos devido a trombocitopenia.

A citogenética da LMA-M2v em pacientes que expressa os antígenos CD19 e C56 tem forte correlação com a translocação t(8;21). A imunofenotipagem deste subtipo de leucemia mieloide aguda apresenta blastos com positividade para os antígenos CD13, CD33, CD65w e anti-MPO, embora os achados imunofenotípicos característicos sejam os antígenos linfoides CD19 e CD56, associados aos CD33 e CD34.

Na morfologia do sangue periférico, não é possível classificação para LMA-M2v. Sugere-se apenas investigação de leucemia mieloide aguda. Apenas por meio da citoquímica e da imunofenotipagem é possível a classificação (Figuras 4.107 e 4.108).

A LMA-M2v apresenta achados morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e clínicos, característicos da doença, e as que expressam o cariótipo t(8;21) têm maior taxa de remissão completa em adultos e também o melhor prognóstico. No entanto, em crianças, os estudos ainda não estão concluídos.

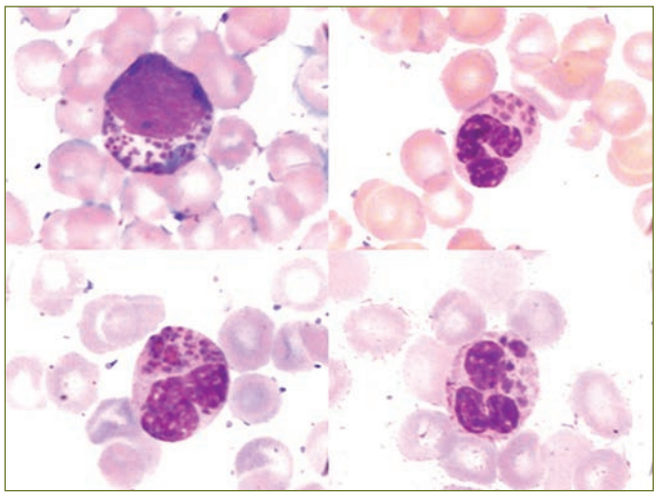


Figura 4.108 LMA-M2v: pseudo-Chediak-Higashi (2.000×)

Leucemia mieloide aguda promielocítica hipergranular (LMA-M3)

Este subtipo é constituído por células identificadas como promielócitos pela classificação do FAB, porém, como estas células não têm aparência de células normais, não devem ser consideradas como blastos. Cerca de 6% a 7% das LMA são do tipo LMA-M3, e sua maior incidência é entre a faixa etária de 30 a 35 anos.

A morfologia das células é bastante característica, já que tem um núcleo excêntrico, citoplasma com abundante granulação e, em alguns blastos, numerosos bastonetes de Auer. Estes últimos, por vezes, são tão intensos que é difícil distinguir o núcleo do citoplasma (*faggot cell*) (Figuras 4.109 e 4.110).

A LMA-M3 tem como característica clínica o sangramento, que é mais forte que se esperava pelo grau de trombocitopenia.

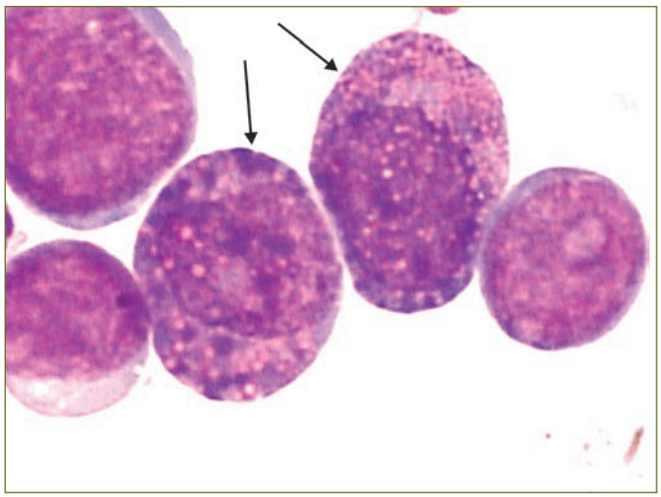


Figura 4.107 LMA-M2v: blastos e dois precursores eosinofílicos (*setas*) (2.000×)

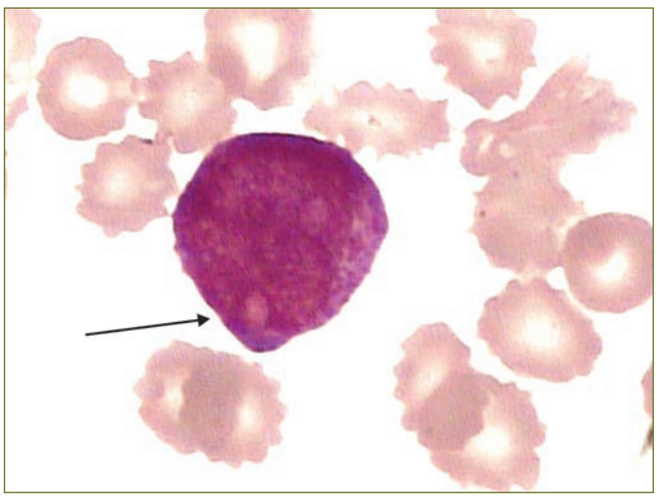


Figura 4.109 LMA-M3: promielócito hipergranúlico com núcleo excêntrico e esboço de nucléolo (*seta*) (2.000×)

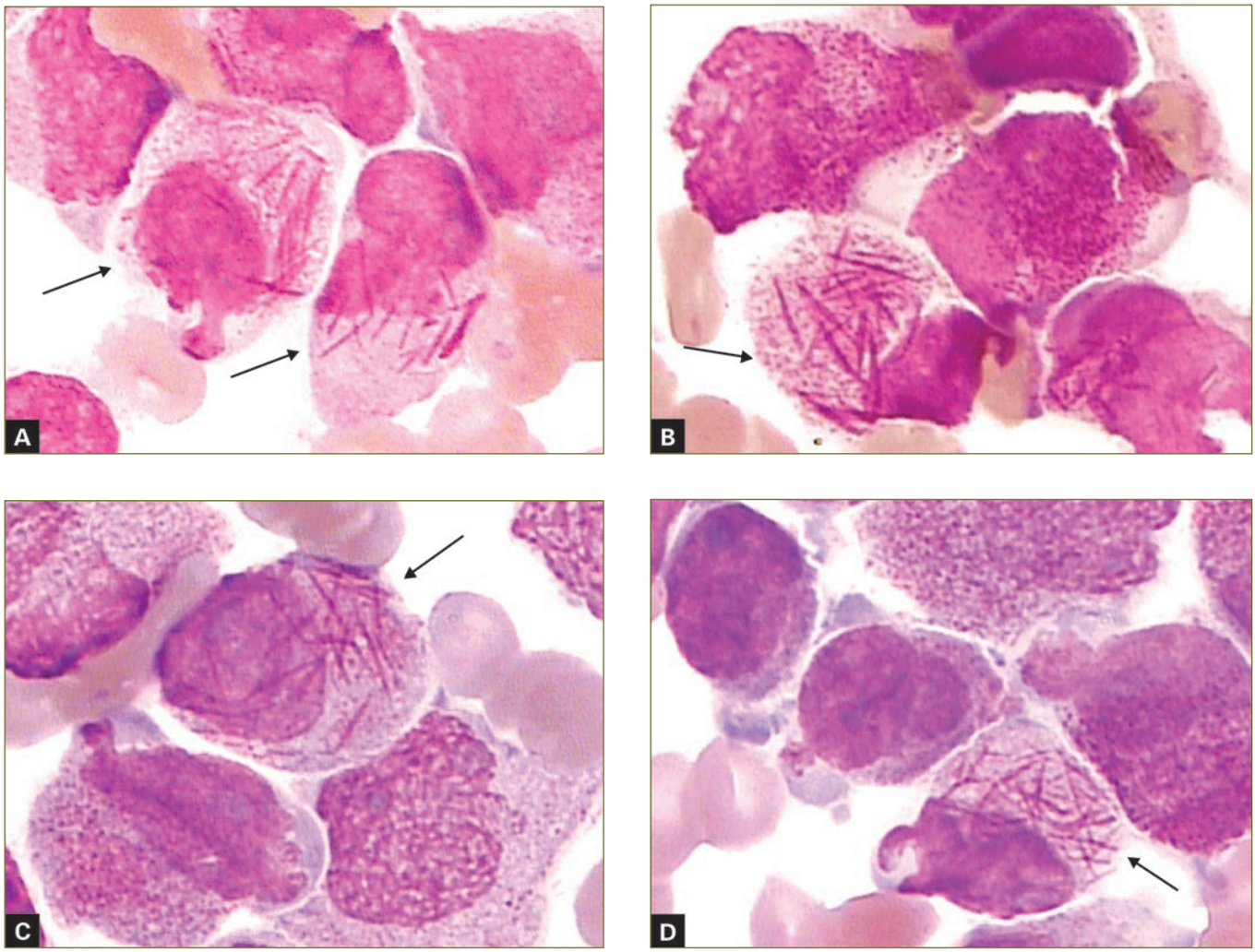


Figura 4.110 (**A** a **D**) LMA-M3: medula óssea. Células de Fagott: promielócitos hipergranúlicos com numerosos bastonetes de Auer (*setas*) (2.000×)

Em 47% dos portadores LMA-M3, os pacientes morrem em decorrência de hemorragias fatais. A coagulação intravascular disseminada (CIVD), bastante frequente neste caso de leucemia aguda, presente em 80% dos pacientes, é aparentemente iniciada pelo material pró-coagulante dos grânulos celulares anormais. Embora seja associada à CIVD, a LMA-M3 tem boa resposta à terapia, além de prognóstico de intermediário a bom.

Na LMA-M3, os "blastos" apresentam marcadores da linhagem mieloides CD13 e CD33. Na citoquímica, a positividade para Sudan Black e MPO é positiva em mais de 3% dos blastos. A imunofenotipagem também revela que, na LMA-M3 ou na LMA-M3v com o cariótipo t(15;17) (q22;q12), caracteriza-se por uma baixa expressão ou ausência de HLA-DR, CD34, CD11a, CD11b e CD18.

Os dois genes envolvidos na LMA-M3 fazem proliferação clonal celular e parada de proliferação respectivamente. O tratamento com quimioterapia associado ao ácido transretinoico impede a involução dos promielócitos e amadurece as células. Em poucos dias de tratamento, observa-se no esfregaço do sangue periférico o desaparecimento dos promielócitos e o surgimento de granulócitos maduros, metamielócitos, bastonetes e segmentados. É importante destacar que, no sangue periférico, ocorre na maioria dos casos uma acentuada leucopenia. Isso dificulta bastante a observação dos promielócitos, às vezes sendo necessária no hemograma a confecção de mais de uma lâmina para a pesquisa dos promielócitos.

Após a introdução do ácido transretinoico na terapia dos pacientes portadores de LMA-M3, a sobrevida livre da doença alcançou o índice de, aproximadamente, 70%.

Leucemia mieloide aguda promielocítica hipogranular: variante (LMA-M3v)

Neste subtipo variante, são vistas raras granulações citoplasmáticas (mais de 50% dos blastos são hipogranúlicos) e os bastonetes de Auer ou os feixes também são raros.

A LMA-M3v apresenta uma leucometria bastante elevada, o que se deve à hipogranulia, pois os promielócitos sem ou com poucos grânulos passam mais facilmente pela medula (os grânulos são rígidos e dificultam a passagem pela medula

óssea). Os promielócitos da LMA-M3v são anômalos (bilobulados, reniformes ou monocitoides) e frequentemente confundidos com os blastos da LMA-M5a. Embora a composição celular da LMA-M3v seja formada por promielócitos hipogranúlicos, observam-se também no esfregaço do sangue periférico alguns promielócitos com granulações azurófilas.

Os promielócitos hipogranúlicos apresentam também grânulos azurófilos, porém de tamanho submicroscópico, não identificados pelos citologistas. Na LMA-M3v, a positividade para Sudan Black e MPO é menos intensa que na LMA-M3, mas as características clínicas, citogenéticas e de imunofenotipagem são as mesmas da forma hipergranular. Apenas 4% dos casos de leucemias mieloides agudas são do tipo LMA-M3v.

Na LMA-M3v, o cariótipo mais frequente é a translocação t(15;17)(q22;q12), e não existe nenhum oncogene conhecido na LMA- M3v. É possível ocorrer uma característica incomum na LMA-M3v: promielócitos ocasionalmente podem ser induzidos a se diferenciar em granulócitos maduros ou macrófagos (Figuras 4.111 e 4.112).

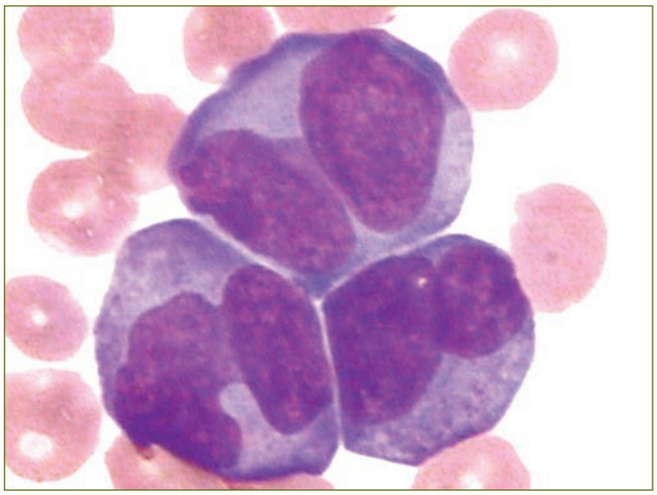


Figura 4.111 LMA-M3v: promielócitos hipogranúlicos anômalos, com morfologia nuclear – bilobulada, reniforme ou monocitoide (2.000×)

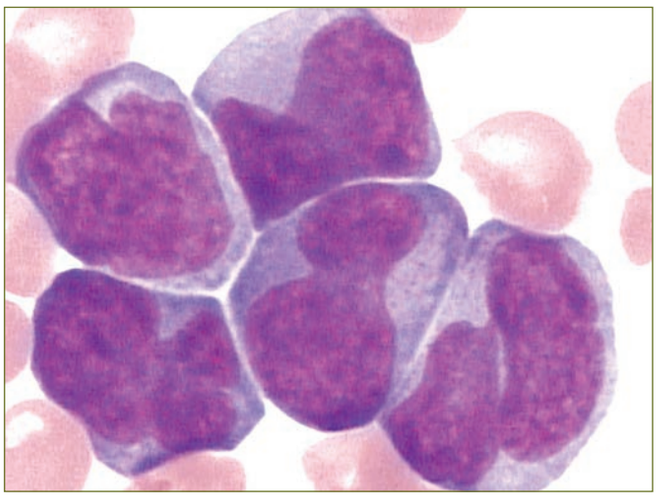


Figura 4.112 LMA-M3v: promielócitos hipogranúlicos anômalos, com morfologia nuclear – bilobulada, reniforme ou monocitoide (2.000×)

Leucemia mieloide aguda mielomonocítica (LMA-M4)

A LMA-M4 caracteriza-se por duas linhagens de células leucêmicas, a granulocítica e a monocítica, tanto no sangue periférico quanto na medula óssea. No entanto, no sangue periférico, não são encontrados monoblastos (Figuras 4.113 e 4.114).

Os monócitos ou precursores monocíticos constituem de 20% a 80% das células da medula óssea. Esse limite de 20% é importante para distinguir a LMA-M4 do subtipo LMA-M2 monocitoide. Cerca de 12% das LMA são do tipo LMA-M4.

A citoquímica da LMA-M4 apresenta uma forte positividade para Sudan Black, ácido periódico-Schiff (PAS) e ANAE, o qual é específico para a linhagem monocítica.

A imunofenotipagem mostra tanto antígenos da linhagem mieloide, CD13 e CD33 quanto os antígenos da linhagem monocítica: CD4, CD14, CD15 e CD11b. Na LMA-M4, quase todos os pacientes apresentam inversão de cromossomo 16 [inv(16)(p13;q22)]. Menos de 10% deles mostram trasnslocação equilibrada entre braço curto de um cromossomo 16 e braço longo de outro cromossomo 16[t(16;16)(p13.1;q22)].

Figura 4.113 LMA-M4: blasto mieloide com bastonete de Auer (*seta*) e dois monócitos anômalos (2.000×)

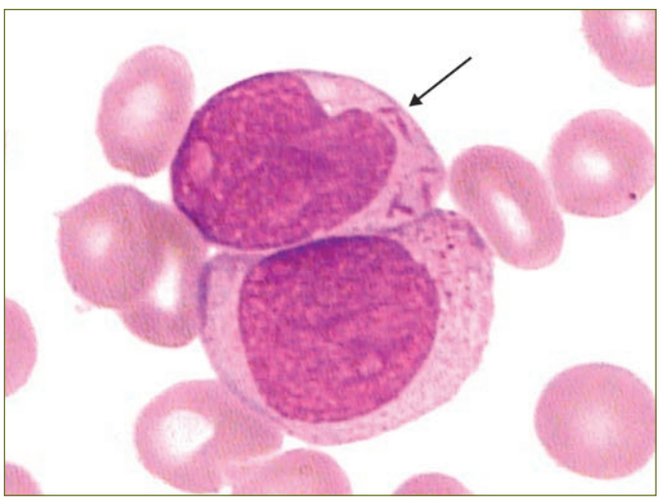


Figura 4.114 LMA-M4: blasto mieloide com vários bastonetes de Auer (*seta*) e um monócito anômalo (2.000×)

Este subtipo de LMA não é comum em crianças e adultos jovens, ocorrendo frequentemente em pacientes com mais de 50 anos, com incidência de 1,4 mulher para cada homem. Os sintomas da LMA-M4 são similares às outras leucemias mieloides agudas, como febre, fadiga, manifestações hemorrágicas, hepatoesplenomegalia e hiperplasia gengival devido à infiltração das células blásticas.

O prognóstico da LMA-M4 é estimado em 70% a 90% de taxa de remissão completa e a doença dura, aproximadamente, 18 meses. Entretanto, em mais de um terço dos casos há recaídas no sistema nervoso central, havendo casos, por exemplo, de mieloblastoma.

Leucemia mieloide aguda: mielomonocítica com eosinofilia (LMA-M4eo)

Este subtipo caracteriza-se pela hipercelularidade, com blastos mieloides, um componente monocítico e aproximadamente 5% de eosinófilos anômalos.

Os eosinófilos da LMA-M4eo apresentam-se em vários estágios de maturação e, por vezes, exibem grandes grânulos basófilos anormais misturados com grânulos eosinófilos normais. Os eosinófilos maduros podem apresentar hipossegmentação, levando à forma de pseudo-Pelger-Huët. Os blastos da LMA-M4eo podem apresentar raros bastonetes de Auer (Figuras 4.115 e 4.116).

A LMA-M4eo representa 4% dos casos de LMA e, em relação às outras leucemias agudas, a LMA-M4eo surge em pacientes mais jovens. A citoquímica tem positividade para PAS e cloroacetato esterase (CAE).

A imunofenotipagem na LMA-M4eo apresenta positividade para os antígenos da linhagem mieloide CD13 e CD33 e também da linhagem monocítica CD14, CD15 e CD11b. Contudo, neste tipo de leucemia aguda pode haver antígenos anômalos linfoides, como o CD2.

A LMA-M4eo apresenta clinicamente os mesmos sinais e sintomas da LMA-M4: fadiga, febre, manifestações hemorrágicas e hepatoesplenomegalia. Esse subtipo de leucemia mieloide aguda responde favoravelmente ao tratamento quimioterápico e tem melhor prognóstico.

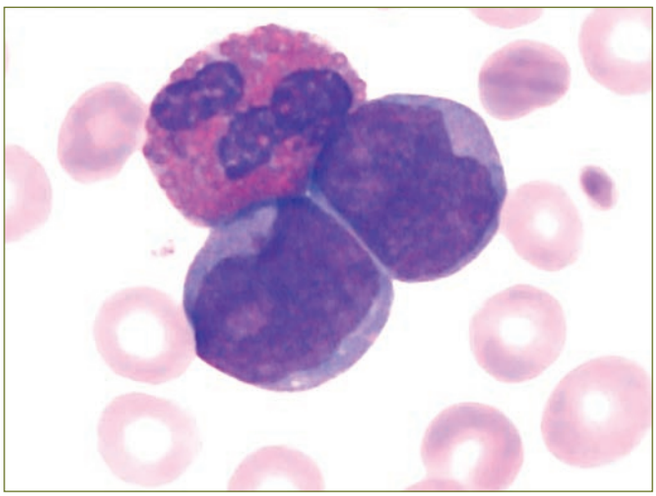


Figura 4.115 LMA-M4eo: blastos mieloides e um eosinófilo com grânulos anômalos (2.000×)

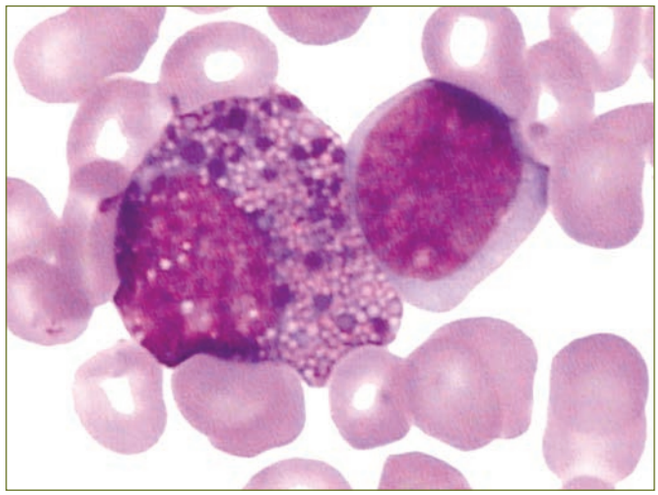


Figura 4.116 LMA-M4eo: blasto mieloide e um precurssor eosinofílico anômalo com grânulos eosinofílicos e basofílicos (2.000×)

Leucemia mieloide aguda: monoblástica sem maturação (LMA-M5a)

A LMA-M5a caracteriza-se pela presença de monoblastos, promonócitos e monócitos em mais de 80% de células não eritroides na medula óssea e também pela elevada leucometria no sangue periférico. Os blastos da LMA-M5a são células grandes com citoplasma abundante e basofílico, por vezes apresentando pseudópodos. O citoplasma do subtipo LMA-M5a é agranúlico, enquanto o subtipo LMA-M5b pode apresentar grânulos no citoplasma.

Geralmente, o núcleo é redondo com cromatina frouxa apresentando um ou mais nucléolos proeminentes. Nesta leucemia, não costumam ser observados bastonetes de Auer (Figuras 4.117 a 4.121).

Este subtipo de leucemia aguda representa 12% de todas as leucemias agudas e é mais frequente em pacientes jovens que a LMA-M5b. A LMA-M5a apresenta envolvimento extracelular na forma de lesões cutâneas, infiltrações na gengiva e doenças do sistema nervoso central. Também podem ser vistas complicações associadas a CIVD, porém em menor grau que na LMA-M3. Tumores de intestino podem ser vistos na LMA-M5a.

Na LMA-M5a, a hiperleucocitose é mais frequente que em outras leucemias agudas e também tem um prognóstico menos favorável pela menor duração a respostas. Os achados imunofenotípicos característicos da LMA-M5a são os antígenos da linhagem mieloide CD33 positivos e o CD13 negativo. Os antígenos de linhagem monocítica CD14 e CD15 são positivos e o marcador CD34 geralmente é negativo.

Na citoquímica, a alfanaftil acetato e a alfanaftil butirato esterase são positivas em 80% dos blastos. Nesse subtipo de leucemia mieloide aguda, ocasionalmente, as células leucêmicas não se coram pela esterase não específica, e o diagnóstico deve ser obtido por meio de imunofenotipagem.

O cariótipo presente na LMA-M5a é a translocação t(9;11)(p22;p23). O oncogene c-ets-1 transloca para 9p22 na região do gene do interferon-alfa.

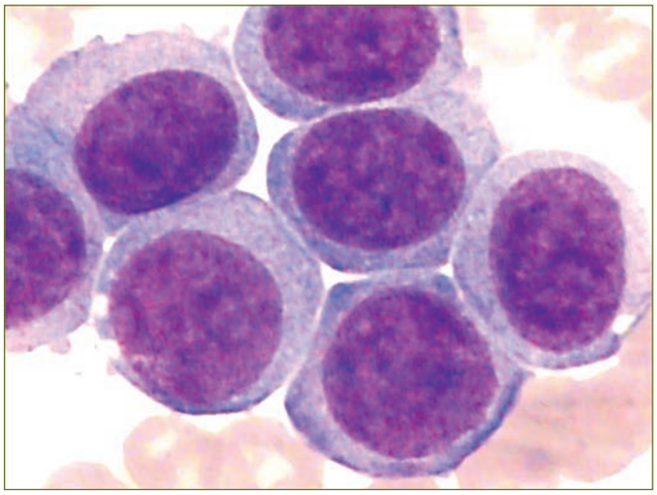


Figura 4.117 LMA-M5a: numerosos monoblastos apresentando citoplasma abundante, basofílico e agranúlico (não são observados bastonetes de Auer). Núcleo redondo com cromatina frouxa e ocasional nucléolo (2.000×)

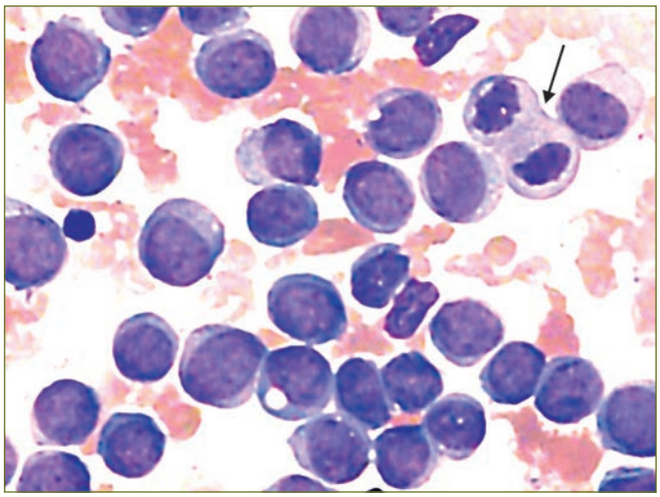


Figura 4.119 LMA-M5a: evidente leucocitose com monoblastos apresentando citoplasma abundante, basofílico e agranúlico (não são observados bastonetes de Auer). Núcleo redondo com cromatina frouxa e ocasional nucléolo e presença de mitose (*seta*) (800×)

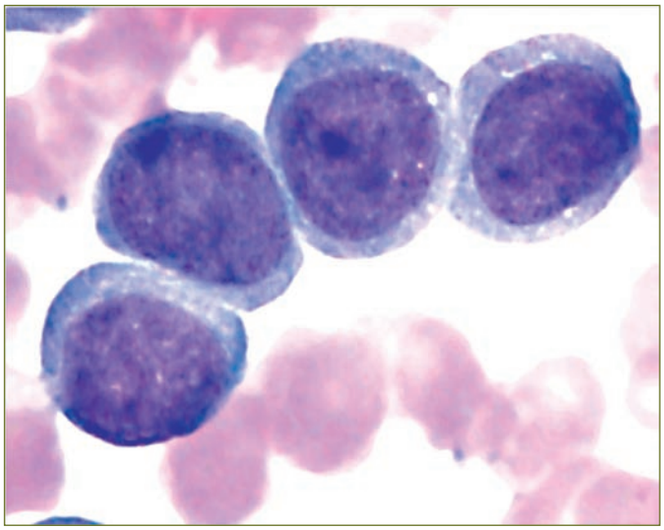


Figura 4.118 LMA-M5a: monoblastos apresentando citoplasma abundante, basofílico e agranúlico (não são observados bastonetes de Auer). Núcleo redondo com cromatina frouxa e ocasional nucléolo (2.000×)

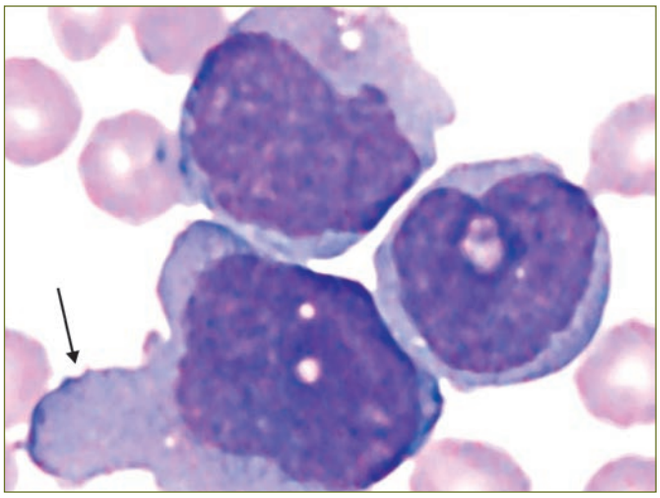


Figura 4.120 LMA-M5a: monoblastos com citoplasma abundante, basofílico e agranúlico, apresentando pseudópodo (*seta*). Núcleo com cromatina frouxa e ocasional nucléolo (2.000×)

Leucemia mieloide aguda: monocítica com maturação (LMA-M5b)

A LMA-M5b caracteriza-se pela presença de células monocitárias anômalas (monócitos, promonócitos e monoblastos). No sangue periférico, os monoblastos estão em menor número que na LMA-M5a e, na medula óssea, o componente monoblástico é inferior a 80% das células não eritroides.

Neste subtipo, mais de 20% dos blastos apresentam maturações como grânulos citoplasmáticos e contorno irregular do núcleo (Figuras 4.122 e 4.123). Como na LMA-M5a, a leucometria também é bastante elevada na LMA-M5b, sendo mais um mau prognóstico desta leucemia aguda.

Na citoquímica, mais de 80% das células leucêmicas da LMA-M5a e M5b são positivas para alfa-NAE e alfa-NBE. Na

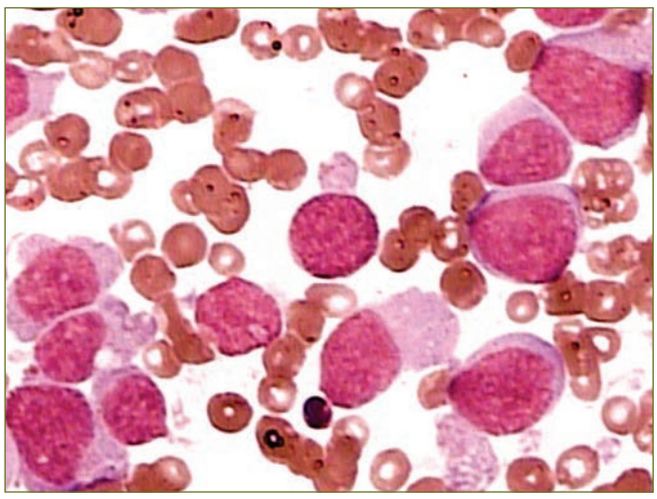


Figura 4.121 LMA-M5a: medula óssea; monoblastos (2.000×)

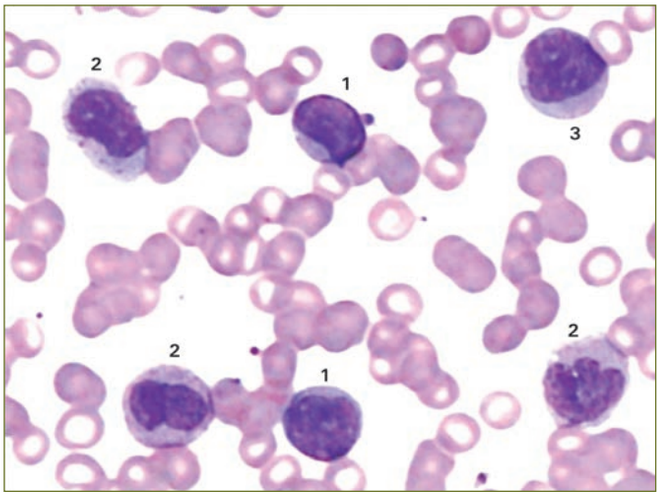


Figura 4.122 LMA-M5b: blasto (**1**); monócito (**2**) e promonócito (**3**) (800×)

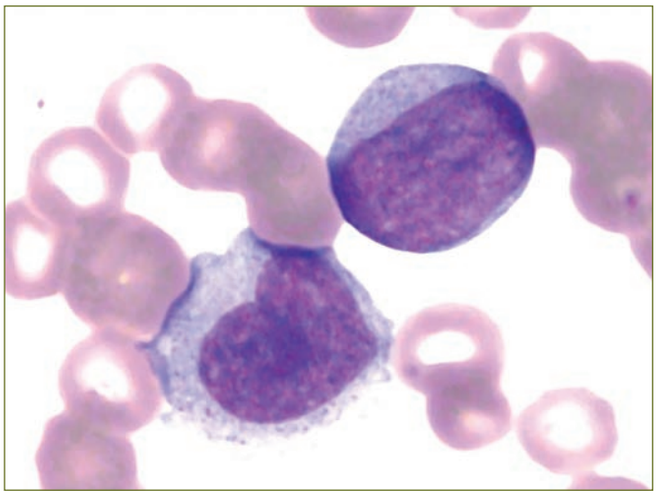


Figura 4.123 LMA-M5b: monoblasto e monócito (2.000×)

imunofenotipagem, a LMA-M5b tem achados característicos que são positividade para CD33, fraca positividade para CD4 e negatividade para CD13 e CD34.

Para esse subtipo de LMA, em especial, é necessário um esfregaço do sangue periférico de qualidade sem anticoagulantes, para total preservação da morfologia celular e devida classificação. Tal procedimento é realizado por causa da delicada diferença morfológica entre as células da LMA-M5b, com este subtipo.

A lisozima, enzima com atividade de muramidase e ação antibacteriana contra bactérias gram-positivas, geralmente se apresenta várias vezes aumentada na LMA-M5b.

Leucemia mieloide aguda: eritroleucemia (LMA-M6)

A LMA-M6 caracteriza-se pela presença de mais de 50% de eritroblastos entre as células nucleadas da medula óssea. Desse modo, 30% ou mais das células não eritroides são mieloblastos.

Nesta leucemia aguda, os eritroblastos apresentam anormalidades morfológicas que, por vezes, são acentuadas, como: formas nucleares atípicas, formas gigantes multinucleadas e pseudópodos e vacúolos que são próprios dos proeritroblastos e eritroblastos basófilos. Geralmente, há granulócitos envolvidos no processo neoplásico, mas a predominância é dos eritroblastos (Figuras 4.124 a 4.127).

A LMA-M6 é a única leucemia aguda que pode ser diagnosticada quando a quantidade de blastos mieloides é menor que 20% na medula óssea. Ocorre mais frequente em homens que em mulheres e a faixa etária de maior incidência da doença é 50 anos. Corresponde a 3% de todas as leucemias mieloides agudas. A anemia e a dor óssea são os dados clínicos mais importantes. Nos testes laboratoriais, o fator antinúcleo (FAN) é positivo e o teste de Coombs, alterado. Além disso, observa-se hipergamaglobulinemia.

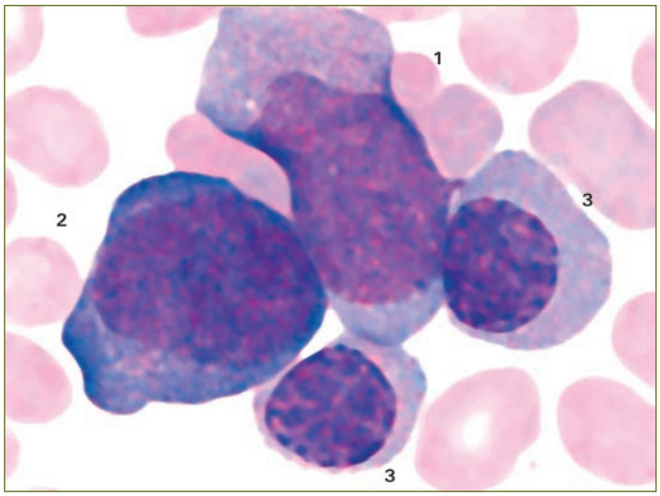


Figura 4.124 LMA-M6 (eritroleucemia). Blasto mieloide (**1**); proeritroblasto (**2**); eritroblasto policromático (**3**) (2.000×)

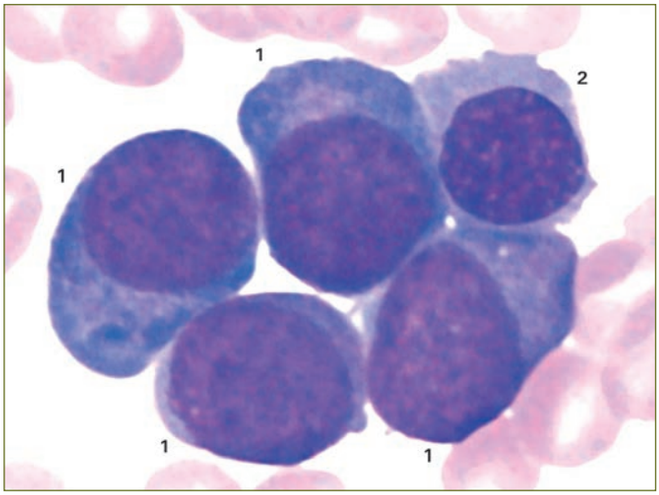


Figura 4.125 LMA-M6 (eritroleucemia): proeritroblasto (**1**); eritroblasto policromático (**2**) (2.000×)

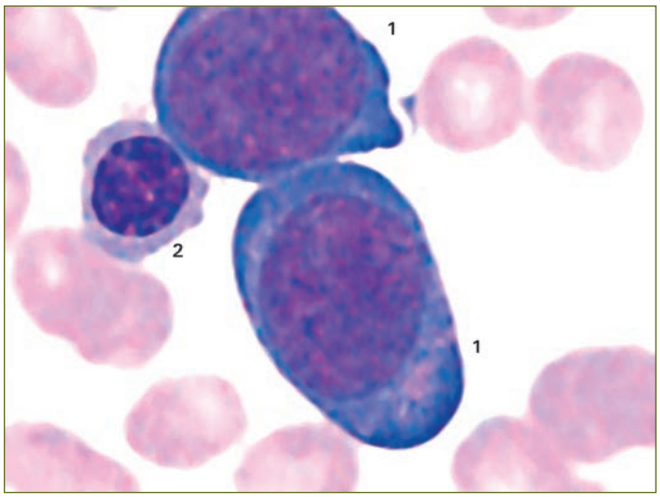


Figura 4.126 LMA-M6 (eritroleucemia): proeritroblasto (**1**); eritroblasto ortocromático (**2**) (2.000×)

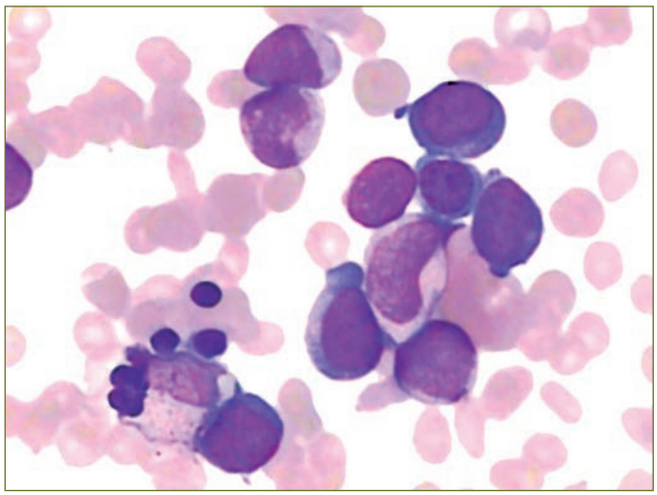


Figura 4.127 LMA-M6 (eritroleucemia): várias formas da linhagem eritroide e blastos mieloides (800×)

Na citoquímica, as células eritroides têm positividade grosseira no PAS e os mieloblastos têm positividade para Sudan Black. A imunofenotipagem para as células da linhagem mieloide apresenta positividade para o CD33 e o CD13, e as células eritrocíticas podem ser identificadas pela expressão da glicoforina.

Na LMA-M6, é muito raro, quando os granulócitos não estão envolvidos no processo neoplásico e, assim, predominam apenas os eritroblastos primitivos. Esta condição tem sido chamada de mielose eritêmica. Geralmente, ocorre uma mistura de proporções variáveis de células eritroides e mieloblastos, com ocasionais elementos monocíticos e megacariocíticos anormais. O termo eritroleucemia foi empregado para caracterizar tal subtipo de leucemia mieloide aguda.

Raramente, na mielose eritêmica inicial, pode ser observada uma progressão para a eritroleucemia e desta para a leucemia mieloblástica aguda no mesmo paciente. Esta evolução é descrita como "síndrome de Guglielmo" (Gunz, 1974), mas esse termo é raramente utilizado pela classificação FAB.

Leucemia mieloide aguda: megacarioblástica (LMA-M7)

Somente a partir de 1985 esta leucemia integrou a classificação do grupo FAB, passando a representar apenas 3% de todas as leucemias mieloides agudas. Nessa leucemia aguda, são vistos blastos da linhagem megacariocítica e também da linhagem mieloide.

Muitas vezes, os blastos da leucemia megacarioblástica estão listados como indiferenciados e podem ser confundidos com os blastos da leucemia linfoide aguda LLA-L1, L2 e também com os blastos mieloides da LMA-M0 e da LMA-M1. Entretanto, os blastos da LMA-M7 apresentam-se maiores e com projeções citoplasmáticas em cordão. Às vezes, eles exibem bolhas citoplasmáticas que sugerem sua diferenciação megacariocítica.

A LMA-M7 pode manifestar-se como leucemia secundária, o que é visto após prévia quimioterapia, síndromes mieloproliferativas e mielodisplasia transformada. Na LMA-M7, são comuns as lesões osteocleróticas e osteolíticas e, quando a doença é diagnosticada em bebês, geralmente há um mau prognóstico. A LMA-M7 é vista com frequência em pacientes com síndrome de Down.

No sangue periférico, observa-se pancitopenia com anemia e leucopenia acentuada e as plaquetas estão em número reduzido e com respostas deficientes para agregação. São comuns fragmentos de megacariócitos e, na bioquímica, níveis elevados de DHL (Figuras 4.128 e 4.129). Na citoquímica, o Sudan Black é positivo para os mieloblastos e negativo para os megacarioblastos.

A imunofenotipagem para as células mieloides tem positividade para o CD33 e o CD13. Já para as células megacariocíticas, há posivitidade para o CD41, o CD42 ou o CD61. A medula óssea na LMA-M7 apresenta mielofibrose em quase todos

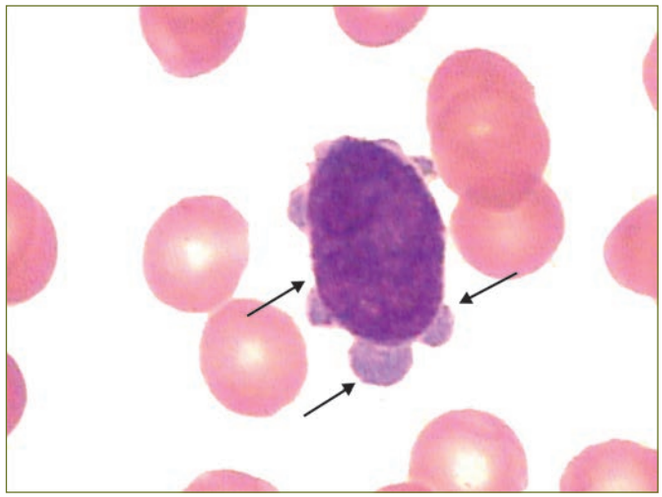


Figura 4.128 LMA-M7 (megacarioblástica): megacarioblasto com Bubbles (*setas*) (2.000×)

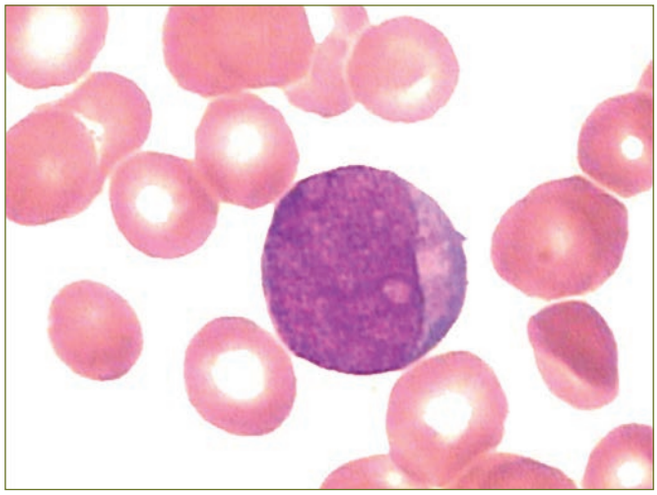


Figura 4.129 LMA-M7 (megacarioblástica): blasto mieloide (2.000×)

pacientes, por vezes tornando a contagem de células blásticas impossível. Assim, entre 20% e 40% desenvolvem mielofibrose aguda. Os megacarioblastos e mieloblastos estão acima de 30% em todas as células nucleadas.

As células blásticas demonstram evidente polimorfismo e são classificadas como não diferenciadas. No entanto, em vários casos pesquisados com pacientes portadores de LMA-M7, revelou-se que alguns pacientes apresentavam blastos com um ou mais sinais de diferenciação, como granulações e bastonetes de Auer. Na LMA-M7, pode haver um número maior de megacariócitos em amadurecimento na medula óssea.

No cariótipo da LMA-M7, anormalidades de cromossomo 21 têm sido relatadas, porém a especificidade ainda é incerta. O prognóstico deste subtipo de leucemia mieloide aguda é relatada como pobre, por meio da terapia convencional, com antraciclina-citarabina.

LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A leucemia linfoide aguda (LLA) tem maior incidência em pacientes de cor branca e entre 2 a 5 anos, diminuindo a frequência na adolescência e na idade adulta, e novamente crescendo na faixa etária de 60 anos. O tipo de LLA mais comum (CD10+), de células precursoras B, é a que predomina na infância, com incidência igual em ambos os sexos, enquanto a LLA de células T (LLA-T) tem predomínio no sexo masculino. Esta leucemia aguda é mais frequente na América do Norte, na Oceania e no norte da Europa.

A LLA é uma proliferação clonal de precursores linfoides anormais na medula óssea e tem como sintomas mais frequentes astenia, palidez, petéquias, taquicardia, equimoses, manifestações hemorrágicas, febre devido à neutropenia com favorecimento bacteriano, dispneia causada pela massa mediastinal, cefaleia causada pelo envolvimento com o sistema nervoso central, adenomegalia, hepatomegalia e dor óssea na criança. No sangue periférico da LLA, observam-se geralmente anemia e plaquetopenia de grau variável. Na maioria dos casos, há leucocitose, porém em alguns pacientes o número de leucócitos pode estar normal ou diminuído, com blastos linfoides. Na medula óssea, o critério para o diagnóstico é a presença de, no mínimo, 30% de células blásticas linfoides. A bioquímica da LLA também apresenta várias alterações, entre elas hiperfosfatemia e hipocalcemia em decorrência de alta destruição celular, aumento do ácido úrico por metabolismo elevado e aumento do HDL pela alta produção celular.

A leucemia linfoide aguda é classificada pela FAB morfologicamente em três categorias: LLA-L1, LLA-L2 e LLA-L3. Cada um desses subtipos apresenta linfoblastos leucêmicos com características próprias. Na criança, aproximadamente 85% dos casos de LLA é do subtipo LLA-L1, cerca de 14% do subtipo LLA-L2 e 1% do subtipo, LLA-L3.

Os casos de LLA no adulto apresentam uma estatística diferente. Desse modo, o subtipo LLA-L2 é visto em 50% a 60% dos casos; o subtipo LLA-L1, em 30% a 40%; e a LLA-L3, em 5% dos casos.

No entanto, a classificação das LLA não se baseia apenas no critério morfológico, pois a citogenética e a imunofenotipagem também são indispensáveis para o diagnóstico. Antes do início do tratamento, são feitas provas de funções hepática e renal, para termo de comparação anterior. Realiza-se o tratamento específico da LLA com quimioterapia e, ocasionalmente, radioterapia.

A quimioterapia é usada em várias fases no ciclo de tratamento e os protocolos são distintos para lactentes, crianças e adultos. A LLA-B é tratada envolvendo protocolos diferentes, além de cursos de fármacos mais curtos e intensos.

O objetivo da quimioterapia na LLA é destruir rapidamente a maioria dos blastos, pelas complicações causadas pela infiltração leucêmica e pela insuficiência da medula óssea. Isso leva o paciente ao estado de remissão, definido como menos de 5% de blastos na medula óssea, contagens diferenciais normais no sangue periférico e nenhum sinal ou sintoma clínico da doença. Habitualmente, os fármacos usados em crianças são a prednisolona ou a dexametasona, enquanto a vincristina e a asparaginase são mais eficazes, o que leva à remissão em mais de 90% das crianças e 80% nos adultos. A remissão não é a cura, mas é um passo inicial valioso para o tratamento. Os pacientes que não entram em remissão têm mau prognóstico.

Após a remissão, outro ciclo é iniciado. Neste, utilizam-se altas doses de quimioterapia, para diminuir a carga tumoral a níveis muito baixos, ou eliminá-la. As doses de quimioterapia são próximas do limite de tolerância do paciente.

Seguindo o protocolo, o tratamento agora é dirigido para o sistema nervoso central. A administração de poucos fármacos sistematicamente atinge o líquido cefalorraquidiano, havendo necessidade de tratamento específico para prevenção e tratamento da LLA no sistema nervoso central.

A manutenção é feita com doses diárias de mercaptopurina por via oral e metotrexato, também por via oral, 1 vez por semana. Acrescenta-se uma dose de vincristina intravenosa junto com 5 dias de corticosteroide oral, mensalmente ou a cada três meses.

A presença do cromossomo Philadelfia na LLA (BCR-ABL positivos) é uma das causas de prognóstico desfavorável da doença – ocorre em 5% dos casos na infância e em 25% nos adultos.

Nestes casos, indica-se o transplante de células-tronco alogênicas. Por sua vez, o inibidor de tirosinoquinase, o mensilato de imatinib, é incluído no protocolo de tratamento destes pacientes.

Os marcadores utilizados para a imunofenotipagem por citometria de fluxo na LLA estão na Tabela 4.1.

As alterações genéticas que ocorrem na LLA são investigadas pelo método de citogenética FISH. Tal método consegue detectar perdas de pequenos segmentos cromossômicos. A Tabela 4.2 classifica as LLA de acordo com as alterações genéticas e prognósticos da doença.

Leucemia linfoide aguda: subtipo 1 (LLA-L1)

Os blastos da LLA-L1 apresentam-se com tamanho pequeno (células pequenas), a cromatina tem um padrão homogêneo e o núcleo é bastante regular com nucléolo de difícil delimitação ou ausente (Figuras 4.130 a 4.132). Além disso, a relação núcleo/citoplasma é elevada, sendo que o citoplasma apresenta fraca basofilia e raras vacuolizações.

Leucemia linfoide aguda: subtipo 2 (LLA- L2)

O tamanho do blasto, o padrão da cromatina, a relação núcleo/citoplasma, a vacuolização e a basofilia citoplasmática são variáveis neste subtipo de LLA (Figuras 4.133 a 4.135). O formato do núcleo é irregular e pode apresentar-se clivado. O nucléolo é múltiplo e proeminente.

Tabela 4.1 Marcadores utilizados para a imunofenotipagem por citometria de fluxo na LLA

Subtipo	Fenótipo comum
LLA precursor B	HLADR, CD19, CD20-/+, CD10, CD34, TDT
LLA pré-B	HLADR, CD19, CD10, CD34, TdT-/+, IgMc, CD20+/-
LLA-B	HLADR, CD19, CD20, CD22, CD10-/+, CD34-, TdT-, sIg
LLA-T	HLADR-/+, CD1, CD2, cCd3, CD5, CD7, CD4/C8, CD10+/-, CD34-/+, CD45, TdT

+/-: variável, na maioria das vezes positiva; -/+: variável, na maioria das vezes negativa; c: citoplasmático.

Tabela 4.2 Alterações genéticas e prognósticas das LLA

Alteração cromossômica	Tipo de leucemia	Prognóstico
t (4;11) MLL/AF4	LLA-B	Pior
t (12; 1) TEL/AML1	LLA-B	Favorável
Hiperdiploidia	LLA-B	Favorável
t (9;22) BCR/ABL	LLA-B	Desfavorável
t (1;19) E2A/PBX1	LLA-B	Desfavorável ou comum
TAL1 deletion SIL-TAL1	LLA-T	–
t (8;14)(q24;q11) c-MYC-TRCA/D	LLA-T	–
t (11;14)(p15;q11) LMO1-TCRD	LLA-T	–
t (11;14)(p13;q11) LMO2-TCRD	LLA-T	–
t (11;14)(p34;q11) TAL1-TCRD	LLA-T	–
t (10;14)(q24;q11) HOX11-TCRD	LLA-T	–

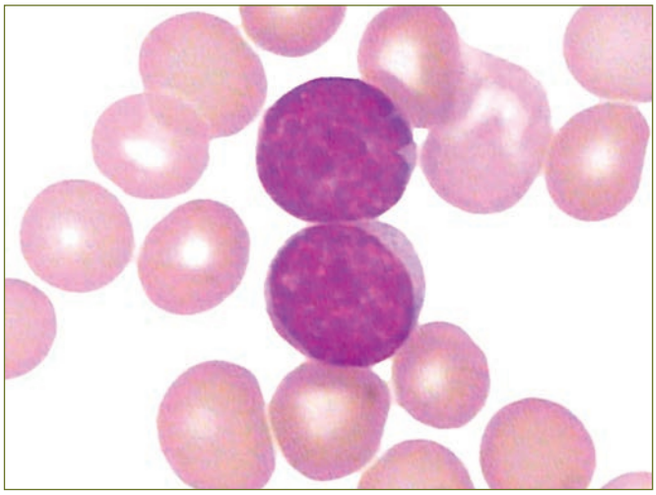


Figura 4.130 LLA-L1: linfoblastos pequenos com cromatina homogênea, sem nucléolo aparente e citoplasma escasso ou ausente (2.000×)

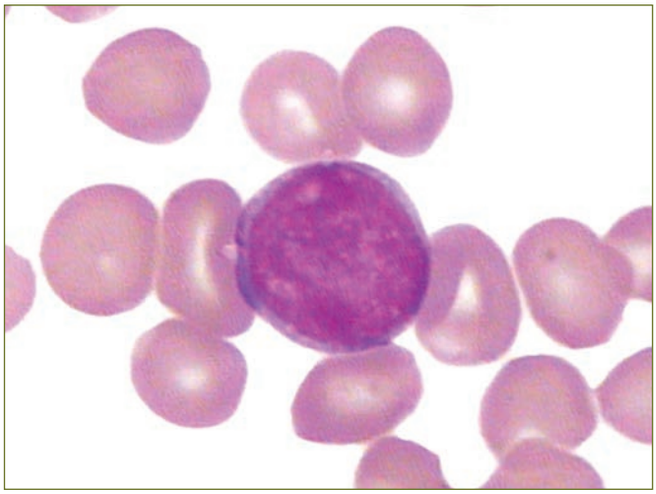


Figura 4.131 LLA-L1: linfoblasto pequeno com cromatina homogênea, sem nucléolo aparente e citoplasma escasso (2.000×)

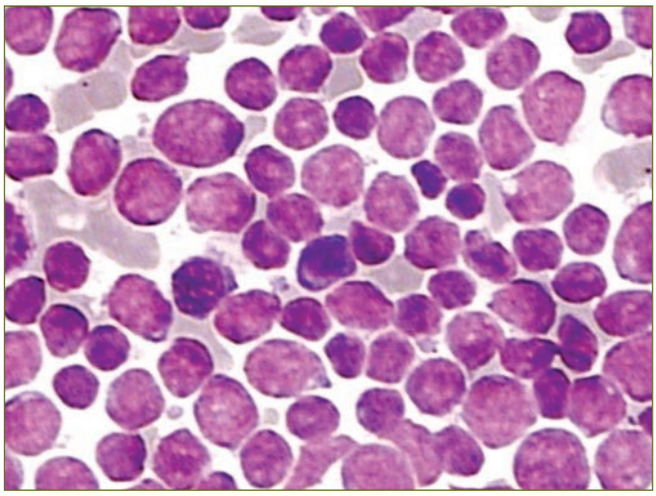


Figura 4.132 LLA-L1 – medula óssea: linfoblastos (2.000×)

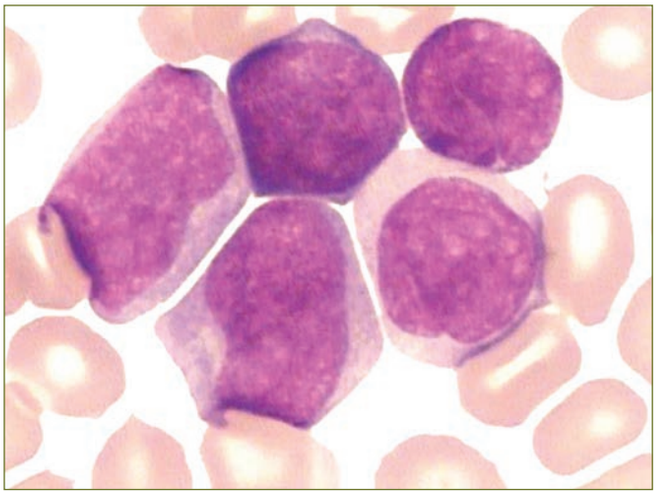


Figura 4.133 LLA-L2: linfoblastos apresentando tamanho, padrão da cromatina e relação núcleo/citoplasma variáveis (2.000×)

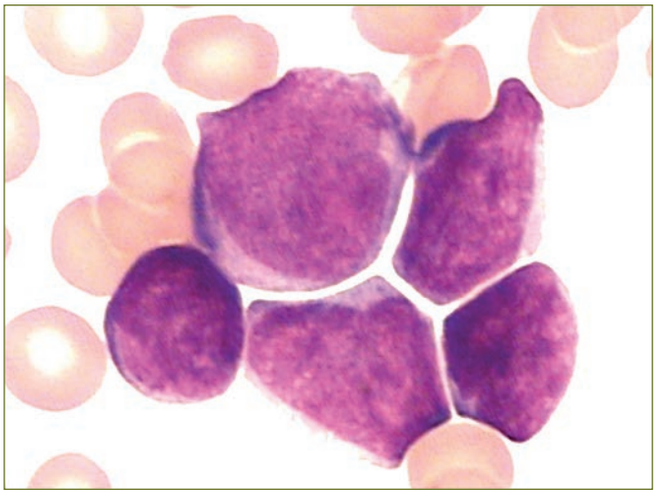


Figura 4.134 LLA-L2: linfoblastos apresentando tamanho, padrão da cromatina e relação núcleo/citoplasma variáveis (2.000×)

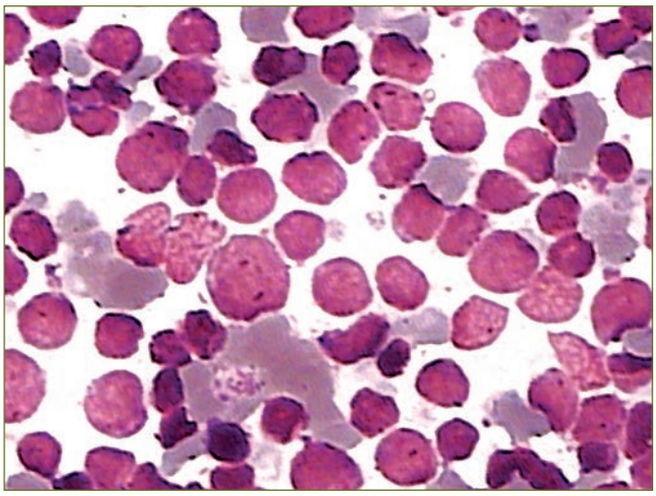


Figura 4.135 LLA-L2 – medula óssea: linfoblastos (2.000×)

Leucemia linfoide aguda de células T (LLA-T)

Este subtipo de LLA apresenta uma variação morfologica muito ampla no sangue periférico, com características próprias. Os blastos apresentam cromatina relativamente densa, com eventuais sobreposições e discreto pleomorfismo nuclear (Figura 4.136).

Com base na classificação FAB para LLA, que se fundamenta exclusivamente na análise morfológica e citoquímica das células malignas (compreendendo os subtipos LLA-L1, L2 e L3), mencionamos esse subtipo na morfologia da LLA-L2, por sua variação morfológica. A classificação da OMS baseia-se em dados do imunofenótipo, do cariótipo e da biologia molecular do paciente, o que possibilita uma classificação de acordo com a linhagem B ou T.

As LLA de linhagem T dividem-se em três subgrupos: LLA pré-T, T-intermediário e maduro. As LLA-T ocorrem em 25% das LLA em adultos e 15% dos casos de LLA em crianças. A frequência da doença é maior em indivíduos do sexo masculino, aparecendo comumente elevada leucometria. O envolvimento do sistema nervoso central e a existência de massa mediastínica são bastante frequentes neste subtipo de LLA.

Leucemia linfoide aguda: subtipo 3 (LLA- L3)

Na LLA-L3, a predominância é de blastos grandes com padrão de cromatina variável. Já o formato do núcleo também é variável, mas geralmente se apresenta ovalado. Por sua vez, o nucléolo normalmente é múltiplo e proeminente (Figuras 4.137 e 4.138).

A relação núcleo/citoplasma é baixa e a basofilia citoplasmática, intensa, além de a vacuolização citoplasmática ser frequente. Os blastos da LLA-L3 são semelhantes às células do linfoma de Burkitt.

LEUCEMIA MISTA OU BIFENOTÍPICA AGUDA

É uma leucemia extremamente rara e incomum, que se caracteriza pela existência dos antígenos de superfície citoplasmática ou nuclear, tanto da linhagem mieloide quanto da linhagem linfoide. A leucemia bifenotípica tem a base biológica desconhecida e comporta-se clinicamente com uma menor taxa de remissão, devendo ser tratada com quimioterapia mais intensa.

No sangue periférico, a presença de blastos de duas linhagens, junto com anemia e plaquetopenia, forma o quadro da leucemia bifenotípica (Figuras 4.139 e 4.140). Aproximadamente 5% dos pacientes com leucemia aguda apresentam marcadores imunofenotípicos, citoquímicos e morfológicos de duas linhagens diferentes de blastos: a linhagem linfoide e a linhagem mieloide.

Em pacientes com síndrome mielodisplásica prévia, leucemias associadas a translocações e leucemias secundárias, a leucemia bifenotípica apresenta índices mais altos. Não há nenhum tratamento específico para a leucemia bifenotípica, porém é utilizado um protocolo híbrido (para leucemia mieloide, na etapa "indução", e para a leucemia linfoide na etapa "manutenção"), com objetivo de destruir os clones malignos.

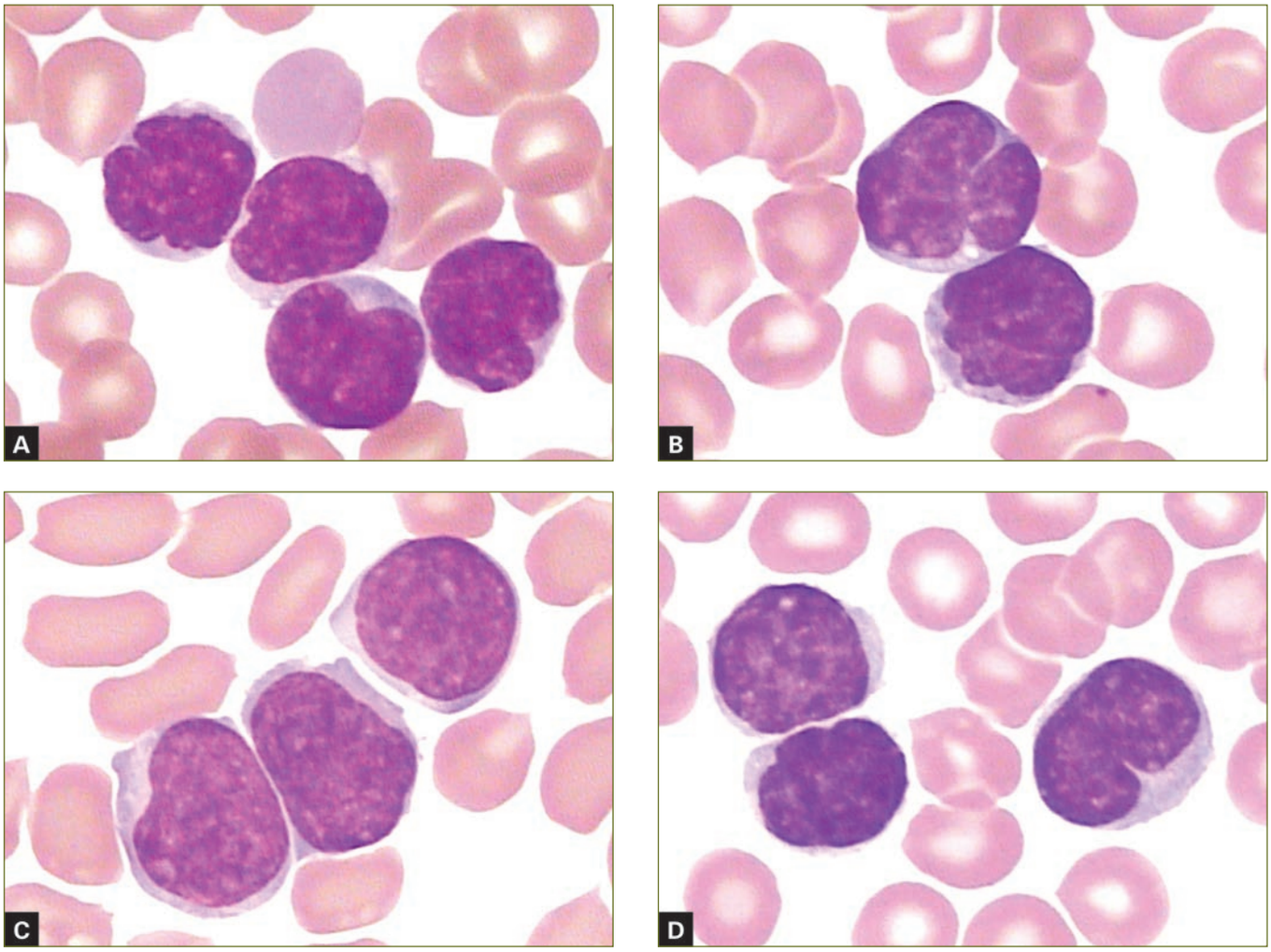


Figura 4.136 (**A** a **D**) LLA-T: blastos apresentando cromatina relativamente densa, com eventuais sobreposições e discreto pleomorfismo nuclear (2.000×)

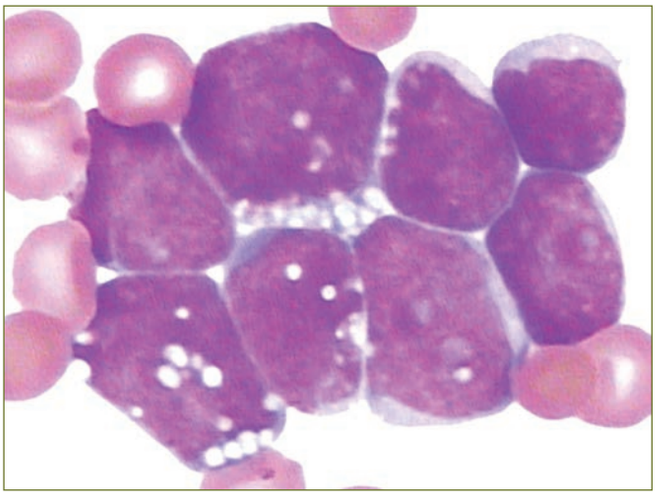


Figura 4.137 LLA-L3: linfoblastos apresentando vacuolização e aumento da basofilia citoplasmática. Núcleo apresentando cromatina frouxa ou com padrão variável e esboço de nucléolo (2.000×)

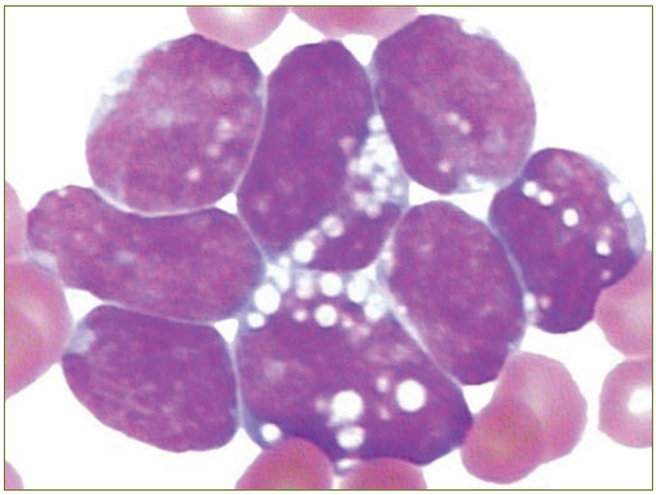


Figura 4.138 LLA-L3: linfoblastos apresentando vacuolização e aumento da basofilia citoplasmática. Núcleo apresentando cromatina frouxa ou com padrão variável e esboço de nucléolo (2.000×)

Na leucemia bifenotípica, o diagnóstico imunofenotípico é feito por meio de um sistema de pontuação. A obtenção de dois ou mais pontos para duas linhagens diferentes define o caso como leucemia bifenotípica. A Tabela 4.3 mostra o sistema de pontuação.

Tabela 4.3 Sistema de pontuação

Pontos	Célula linfoide B	Célula linfoide T	Célula mieloide
2	CD22	C3	MPO
1	CD10, CD19	CD2, CD5	CD13, CD33
0,5	TdT	CD7, TdT	CD14, CD15, CD11b, CD11c

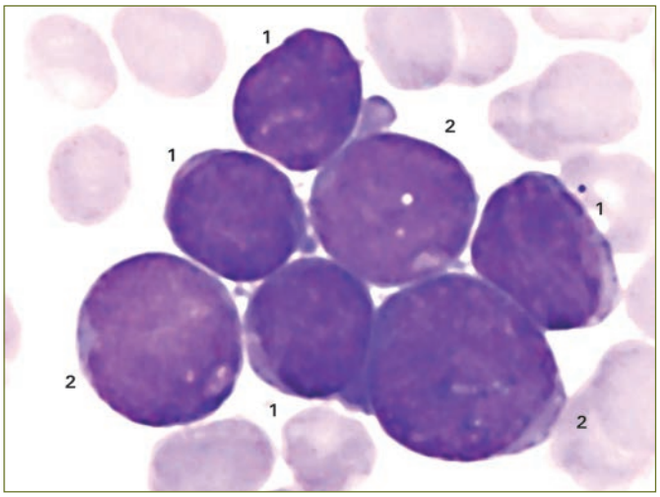


Figura 4.139 Leucemia bifenotípica aguda: blastos linfoides (**1**) e blastos mieloides (**2**) (2.000×)

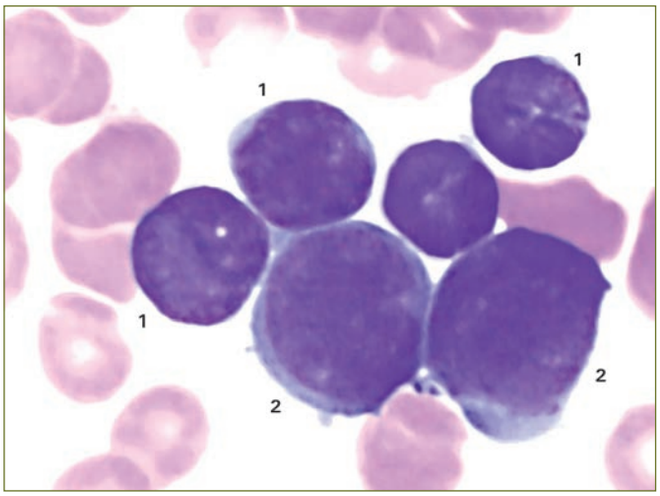


Figura 4.140 Leucemia bifenotípica aguda: blastos linfoides (**1**) e blastos mieloides (**2**) (2.000×)

DOENÇAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

A leucemia mieloide crônica (LMC) é mais comum em homens na faixa etária de 20 a 50 anos e representa cerca de 20% de todas as leucemias, o que equivale a 1,6 caso por 100 mil habitantes. É uma doença resultante da proliferação clonal de uma célula-tronco hematopoética, caracterizada por três fases bem definidas: crônica, acelerada e blástica, e por uma anormalidade citogenética específica, presente em 99% dos casos de LMC, o cromossomo Philadelphia (Ph1). Este nome deve-se ao fato de ter sido descoberto em 1960 por dois cientistas da cidade de Filadélfia, localizada no estado norte-americano da Pensilvânia. O cromossomo Ph1 é produto da translocação recíproca t(9;22) (q34;q11), o qual leva ao surgimento de um gene híbrido BCR-ABL, que desregula a atividade normal da proteína ABL, com atividade da tirosinoquinase. Daí resulta um sinal de transdução descontrolado que conduz à ativação da proliferação celular e, consequentemente, a um distúrbio da hematopoese. Além disso, altera-se a adesão das células ao estroma medular ao mesmo tempo em que reduz a apoptose, que leva ao aumento da sobrevida das células originadas do clone leucêmico.

O diagnóstico deve ser comprovado pela citogenética e, sempre que possível, por exames moleculares que evidenciem a existência do gene de fusão BCR/ABL. Na LMC, é comum em 95% dos casos uma acentuada leucocitose, dos quais 75% ultrapassam 50 mil leucócitos/mm^3. Em 45% dos casos de LMC há mais de 100 mil leucócitos/mm^3.

A biopsia de medula óssea mostra um aumento na fibrose medular, de acordo com a evolução da leucemia. A presença de células mieloides em vários graus de maturação é característica. Na LMC, é bastante comum haver uma basofilia inexplicada, porém se observou que, quanto maior o número de basófilos no sangue periférico, pior o prognóstico do paciente.

Existem algumas variantes clínicas e morfológicas na LMC que citaremos a seguir:

- **Variantes clínicas**:
  - *LMC típica*: com o cromossomo Philadelfia (ph1).
  - *LMC atípica*: sem o cromossomo Philadelfia (ph1).
  - *LMC em bebês*.
- **Variantes morfológicas (raríssimas)**:
  - Leucemia eosinofílica crônica.

Esta doença difere da síndrome caracterizada por uma eosinofilia idiopática. Na variante crônica, detecta-se uma eosinofilia persistente maior que 1.500/μL, com eosinófilos maduros e precursores como mielócitos, promielócitos e até blastos no sangue periférico ou na medula óssea (menor que 20%). Observam-se com frequência anemia e plaquetopenia, além de hipogranulação, vacuolização e hipolobulação nos eosinófilos maduros.

Leucemia basofílica crônica

O quadro clínico é o da LMC, mas com extrema elevação nas contagens de basófilos. Praticamente todos os leucócitos

podem ser basófilos, assim como o número absoluto de neutrófilos pode estar aumentado. Em alguns pacientes, talvez sejam detectados grânulos eosinofílicos e basofílicos na mesma célula. O cromossomo Ph1 pode ou não estar presente.

Leucemia monocítica crônica

Às vezes, essa expressão é aplicada às doenças em que pacientes demonstram um notável aumento de monócitos, além das alterações habituais nos leucócitos observados em casos de LMC. Tal expressão também foi utilizada para pacientes com monocitose modesta que se assemelham àqueles com leucemia pré-leucêmica.

Leucemia neutrofílica crônica

Esta rara síndrome caracteriza-se por um número notavelmente aumentado de neutrófilos maduros no sangue periférico, mas sem um aumento concomitante na quantidade de neutrófilos imaturos. Os neutrófilos podem exibir granulações tóxicas e, por vezes, corpos de Döhle; são comuns com núcleo em anel. O cromossomo Ph1 está ausente. Em outros aspectos, o sangue está normal, exceto por uma anemia modesta e alguns eritrócitos nucleados e plaquetopenia. A hiperplasia granulocítica é evidente na medula, sem mielofibrose. O fígado e o baço estão aumentados, o que demonstra hematopoese extramedular. A sobrevida média é de, aproximadamente, 2 anos, além de a causa da morte ser variável.

A evolução clínica da LMC divide-se em três fases: crônica, acelerada e blástica. Inicialmente, há a fase crônica que é mais prolongada e dura de 4 a 5 anos; segue-se uma fase acelerada, mais curta, em torno de menos de 1 ano; e, finalmente, a fase blástica (crise), habitualmente fatal, com duração de 2 a 10 meses.

Fase crônica

Nesta fase, ocorrem várias alterações clínicas e laboratoriais bem características. No sangue periférico, os granulócitos apresentam-se em todas as fases de maturação, porém são mais encontrados na forma madura (Figuras 4.141 e 4.142). Os blastos e promielócitos estão com contagem abaixo de 10% e basofilia variável. Geralmente, a anemia é discreta, normocrômica e normocítica, com plaquetas normais ou plaquetose com raros casos de plaquetopenia. Além disso, a leucocitose não costuma ser muito elevada. Na bioquímica, entre outros testes, o DHL e o ácido úrico também estão elevados. Fadiga, perda de peso, sudorese, febrículas, discretas hemorragias e esplenomegalia em 80% dos pacientes são os sintomas clínicos mais frequentes.

Fase acelerada

Esta fase caracteriza-se pela progressiva resistência à terapêutica (não responde bem à hidroxiureia). Há também um aumento de células blásticas e promielócitos de 10% a 20%, em geral com basofilia superior a 20%, sendo a leucocitose superior a 100.000 plaquetas/mm^3 na maioria dos casos, além de as plaquetas estarem frequentemente baixas (Figuras 4.143 e 4.144).

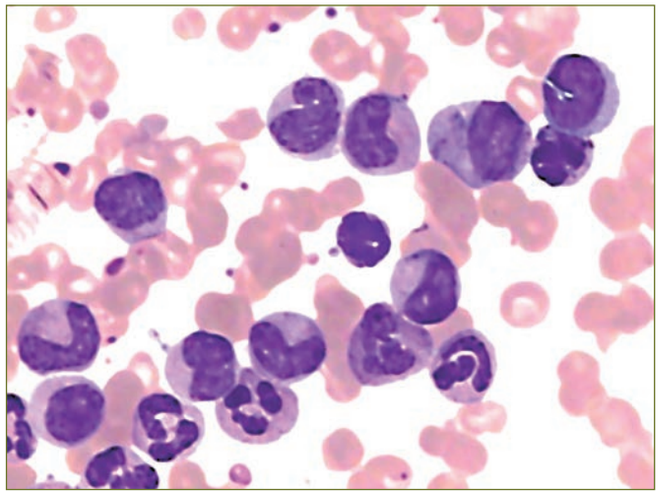


Figura 4.141 LMC – fase crônica: leucocitose com várias formas da linhagem mieloide (800×)

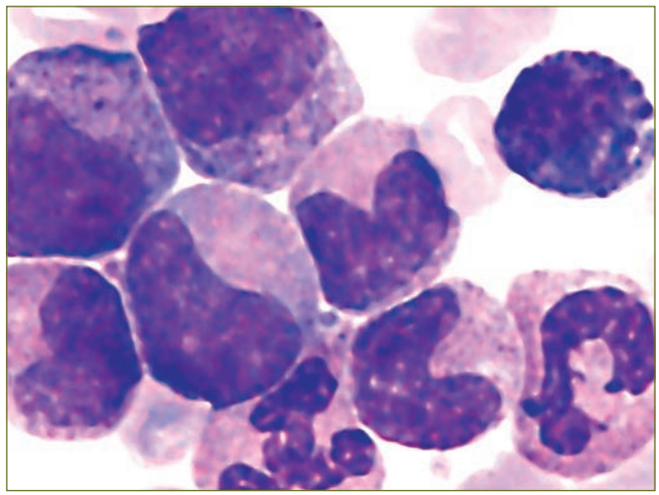


Figura 4.142 LMC – fase crônica: leucocitose com várias formas da linhagem mieloide (2.000×)

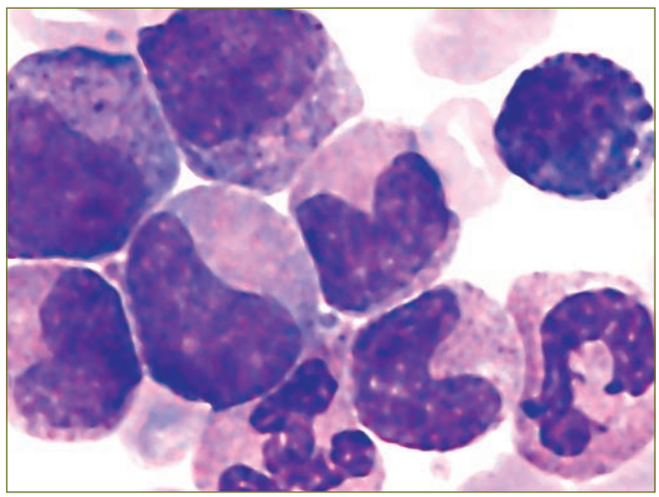


Figura 4.143 LMC – fase acelerada: aumento no número de blastos e basófilos (800×)

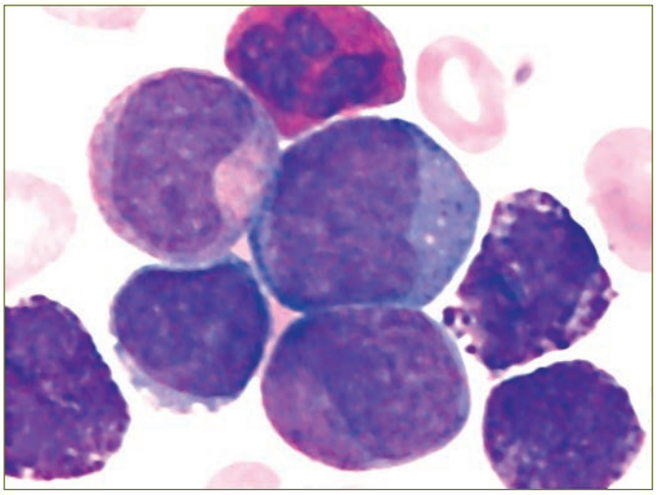


Figura 4.144 LMC – fase acelerada: aumento no número de blastos e basófilos (2.000×)

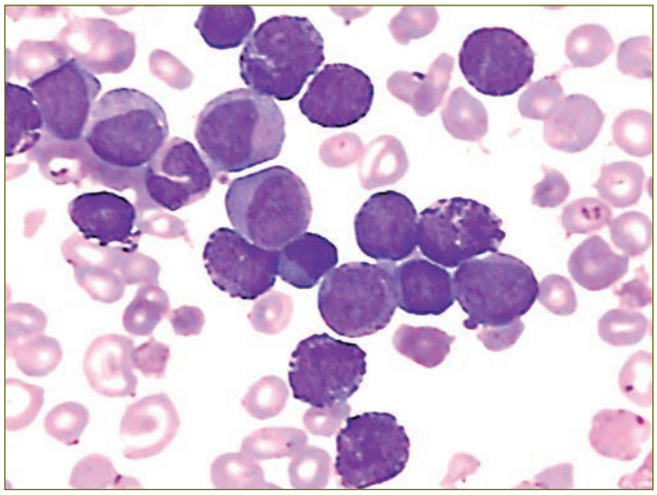


Figura 4.146 LMC: fase blástica (800×)

Geralmente, observa-se a esplenomegalia nesta fase da LMC também. A evolução citogenética aparece com novas anormalidades em adição ao cromossomo Philadelphia. A fase de aceleração é significativa, pois seus sinais significam que a doença está evoluindo e transformando-se na fase blástica.

Fase blástica

Também é conhecida como fase de agudização, comportando-se como uma leucemia aguda. Além de todos os sintomas anteriores, a dor óssea também ocorre nesta fase. É característico o número de blastos na medula óssea e no sangue periférico superior a 30%, o que pode causar confusão com outras leucemias. Essas células, em 50% dos casos, são mieloblastos; 25%, linfoblastos; e, no restante, células indiferenciadas ou bifenotípicas (Figuras 4.145 e 4.146). Com frequência, a basofilia encontrada na fase crônica acentua-se, tornando-se marcada.

Nesta fase, intensificam-se as hemorragias e a anemia. A infiltração extramedular é comum, ou seja, há desenvolvimento de cloroma (ou sarcoma granulocítico), uma coleção sólida de células leucêmicas fora da medula óssea, que ocorre principalmente na pele, nos linfonodos, nos ossos e no sistema nervoso central. Há, ainda, modificação da citogenética com aparecimento de outras alterações, como: duplo Ph1, ganho de um cromossomo 8(t8), isocromossomo 17(17q) e trissomia do 19.

Costuma ser a fase final da evolução da LMC e tem uma alta incidência de mortalidade.

A acentuada leucocitose vista na LMC é causada por vários fatores conjuntos, entre eles:

- Aumento no número de precursores.
- Aumento de mitoses.
- Aumento da sobrevida das células.
- As células malignas amadurecem mais rápido.
- Apoptose (morte celular) interrompida pelo gene Cr Ph1.

As medicações usadas no tratamento da LMC serão citadas para que o citologista acompanhe melhor a evolução da doença.

- **Bussulfano (alcilante)**: baixa leucócitos e plaquetas.
- **Hidroxiureia (desoxinucleotídio)**: inibe leucócitos e plaquetas.
- **Interferon**: baixa proliferação granulocítica.
- **Quimioterapia**: inibe toda medula óssea, porém não consegue eliminar o clone Ph1+, não levando à cura da doença.
- **Mesilato de imatinib**: elimina o clone Ph1, anulando a função da tirosina cinase, proteína produzida pelo BCR-ABL. Dessa maneira, ele eleva o índice de sobrevida livre da doença em, aproximadamente, 95%.

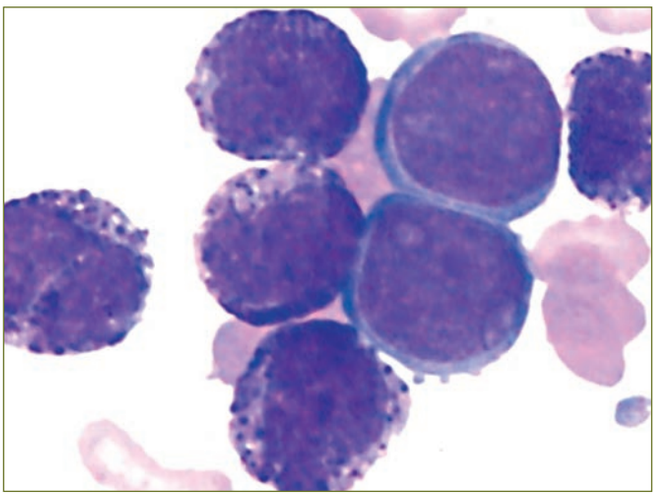


Figura 4.145 LMC – fase blástica (2.000×)

MIELOFIBROSE

Anteriormente, vários nomes foram dados a essa doença, como: mieloloesclerose, metaplasia mieloide agnogênica, metaplasia mieloide idiopática e osteoesclerose. É uma doença de evolução crônica, de origem clonal assim como a LMC, que se instala a partir de células indiferenciadas (*stem cell*) medular.

A mielofibrose é mais frequente em homens com idade média de 60 anos. A sobrevida à doença é mediana e a etiologia, desconhecida. No entanto, após experiências com cobaias expostas a solventes e agentes químicos, observaram-se quadros similares à mielofibrose nas cobaias.

A mielofibrose exibe proliferação celular clonal e a fibrose progressiva restringe a atividade hematopoética. Utilizando vários marcadores genéticos, foi claramente demonstrado que a proliferação hematopoética é clonal, envolvendo granulócitos, eritrócitos e megacariócitos.

Para definir a mielofibrose, a presença de fibrose na medula óssea não é o bastante, já que outras doenças também podem exibir esse achado. A esplenomegalia volumosa é muito frequente e a anemia consta como queixa habitual na mielofibrose.

Outras manifestações clínicas, como fadiga, fraqueza, dispneia, hemorragias relacionadas com trombocitopenia, disfunção plaquetária, petéquias e equimoses, também são vistas na mielofibrose.

Na fase mais avançada da doença, surgem sudoreses noturnas, icterícia, dores ósseas, perda de peso e metaplasia mieloide. O hemograma na mielofibrose apresenta alterações quantitativas e qualitativas nas linhagens eritroide, granulocítica e plaquetínea.

Em geral, a anemia é normocítica e normocrômica. Todavia, são comuns hemácias em gota ou lágrima (dacriócito), basófilos, eritroblastos e desvio à esquerda, os quais podem chegar a blastos (Figuras 4.147 a 4.150).

Os eritroblastos e os blastos mieloides formam um quadro leucoeritroblástico, o qual é característico da mielofibrose. É frequente a anomalia de pseudo-Pelger-Huët.

Policromasia com grau moderado de reticulocitose, plaquetas gigantes e aumento da basofilia em 35% dos casos também são observados na mielofibrose. Por vezes, a presença de várias formas de células mieloides forma um quadro semelhante à LMC.

Geralmente, a medula óssea está com hipercelularidade ou com fibrose completa. A intensa fibrose medular costuma

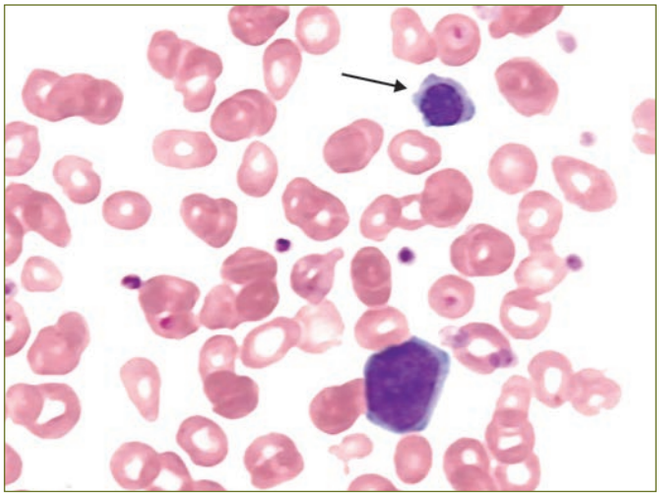


Figura 4.147 Mielofibrose: blasto, hemácias em lágrima e um eritroblasto (*seta*) (800×)

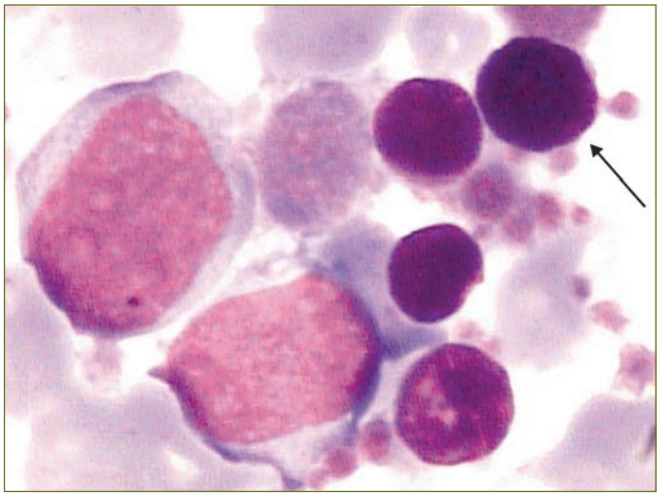


Figura 4.149 Mielofibrose forma grave: blastos, macroplaquetas e micromegacariócito (*seta*) (2.000×)

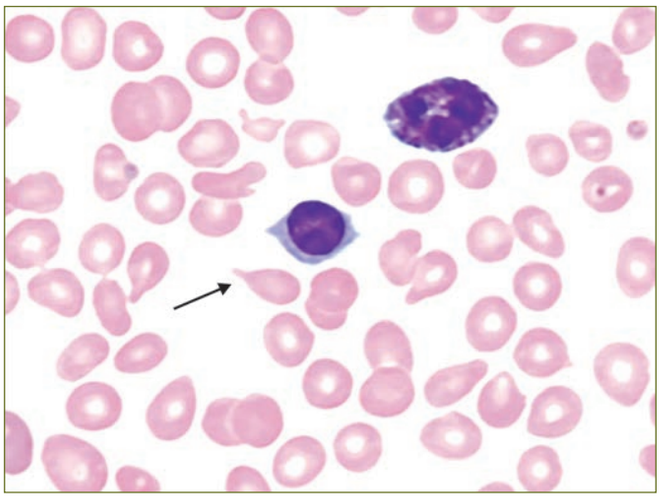


Figura 4.148 Mielofibrose: eritroblasto, hemácia em lágrima (*seta*) e um basófilo (1.200×)

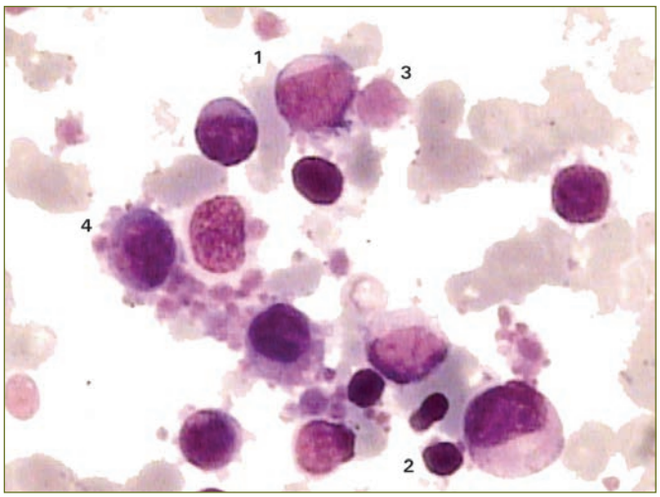


Figura 4.150 Mielofibrose forma grave: blasto (**1**), eritroblastos (**2**), macroplaqueta (**3**) e megacariócito (**4**) (800×)

dificultar a aspiração da medula óssea (punção "seca"), tornando necessária a realização de biopsia para documentar a fibrose e outras alterações características, como a hiperplasia megacariocítica. Além da fibrose, por causa das fibras colágenas e reticulínicas, encontra-se, em alguns casos, a neoformação óssea que resulta em osteopetrose medular.

O tratamento da mielofibrose consiste no controle da proliferação das linhagens hematopoéticas, da fibrose e das complicações. O uso de agentes para reduzir a proliferação celular, particularmente a linhagem megacariocítica, parece influenciar no desenvolvimento e na regressão da fibrose medular. Hidroxiureia, bussulfano e interferon são os medicamentos mais utilizados e capazes de controlar, pelo menos em parte, a proliferação celular e a fibrose.

POLICITEMIA VERA

A policitemia vera ou rubra-vera caracteriza-se pela proliferação das linhagens eritrocitária, granulocítica e megacariocítica. Contudo, sua característica mais proeminente é o aumento da massa eritrocitária, o qual eleva o hematócrito. Esse crescimento eritrocitário não depende dos níveis de eritropoetina, o que diferencia da policitemia secundária.

O excesso de eritrócitos aumenta o volume sanguíneo, tornando-o mais espesso. Desse modo, o sangue passa a fluir com menor facilidade pelos vasos sanguíneos (hiperviscosidade). No entanto, o número de eritrócitos pode estar aumentado antes dos sintomas.

A policitemia vera é uma doença rara. Apenas se manifesta em 5 a cada 1 milhão de pessoas. Além de insidiosa, em geral surge na faixa etária dos 60 anos, mas pode ocorrer em adultos jovens, sendo raramente vista em crianças. A doença pode evoluir para mielofibrose, mielodisplasias e leucemias agudas. A policitemia vera é mais frequente em judeus asquenazis.

Geralmente, é assintomática, embora de 30% a 40% dos pacientes se queixem de sudorese, cefaleia, tonturas e pruridos (principalmente após um banho quente). A visão pode estar distorcida e o indivíduo, ser acometido por *flashes* de luz. A pele, especialmente a da face, pode tornar-se avermelhada. Em pacientes não tratados, é altíssima a incidência de tromboses de vários tipos, como: acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, trombose venosa profunda, trombose de veias hepáticas, trombose do sistema portocava e embolia pulmonar.

A úlcera péptica e a gota podem associar-se à policitemia vera. Geralmente, observa-se esplenomegalia, mas, quando é feita a esplenectomia, pode haver uma trombocitose incontrolável.

No hemograma (Figuras 4.151 a 4.154), o número de eritrócitos está elevado e geralmente são observadas desproporções nos valores hematimétricos do tipo, hematócrito alto com hipocromia e microcitose. Isso ocorre frequentemente em pacientes que se submeteram à sangria ou tiveram hemorragia digestiva (os números de eritrócitos na policitemia vera ficam entre 6 e 12 milhões por mm^3 e os da hemoglobina, entre18 e 24g/dL). A contagem de reticulócitos está um pouco elevada e as plaquetas aumentadas em número podem chegar a mais de 1.000.000 plaquetas/mm^3, com a função de agregação alterada.

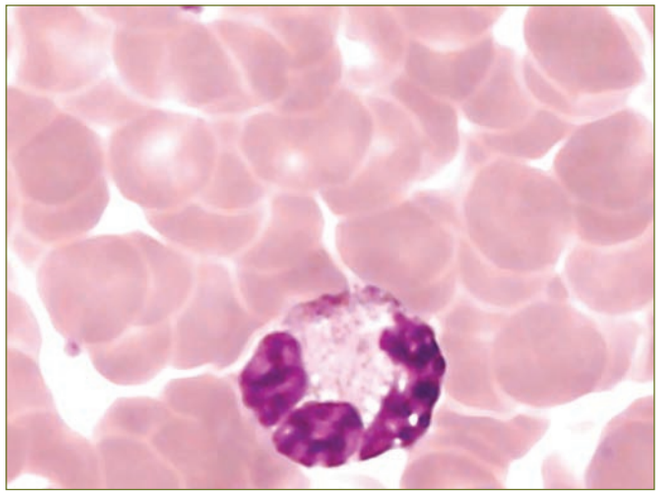


Figura 4.151 Policitemia vera: evidente eritrocitose (2.000×)

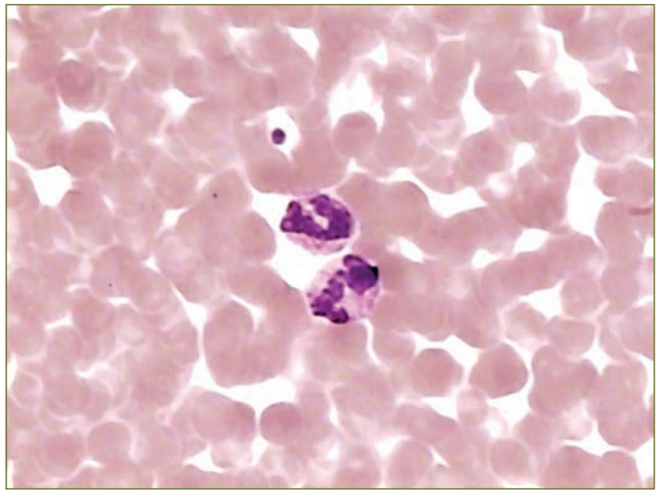


Figura 4.152 Policitemia vera: evidente eritrocitose (800×)

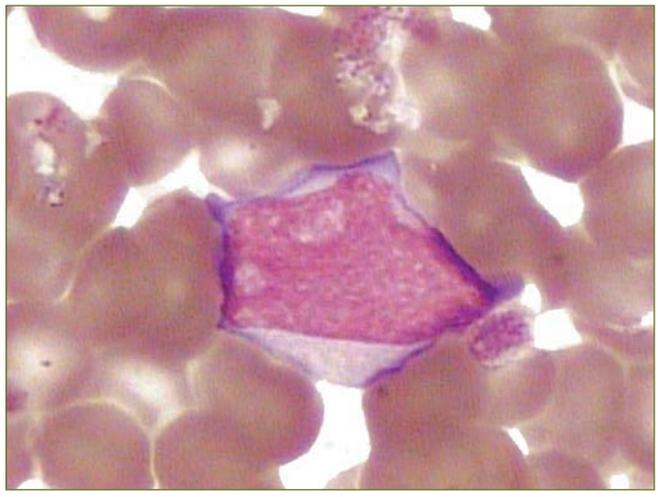


Figura 4.153 Policitemia vera: evidente eritrocitose – blasto (2.000×)

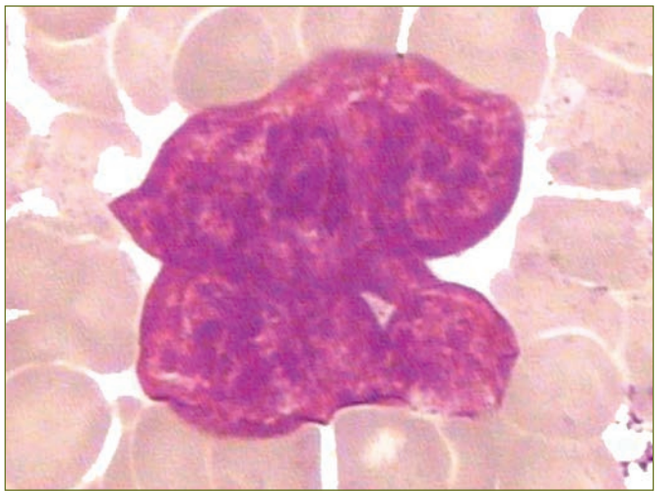


Figura 4.154 Policitemia vera: evidente eritrocitose – núcleo desnudo de megacariócito (2.000×)

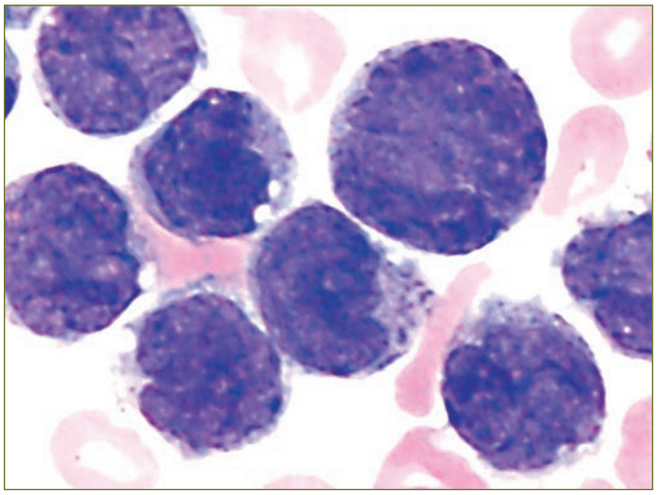


Figura 4.155 LMMC: monócitos displásicos com granulações atípicas e vacuolização (2.000×)

A relação plasma/citrato de sódio (muito anticoagulante e pouco plasma, devido ao aumento do hematócrito) pode levar a alterações nos resultados do TP-AE e TTPA.

Observa-se na medula óssea hiperplasia das células eritroides, leucocitárias e plaquetárias. Cerca de 95% dos pacientes com policitemia vera apresentam a mutação genética JAK2, o que auxilia no diagnóstico. Isso porque ele se fundamenta, principalmente, na exclusão de outras patologias e quadros reacionais, como também a concentração normal ou aumentada da eritropoetina e biopsia de medula óssea evidenciam hipercelularidade medular com pan-mielose. O tratamento visa a reduzir o risco de eventos tromboembólicos e inclui sangrias e antiagregação plaquetária nos casos de baixo risco até o uso de hidroxiureia nos pacientes de alto risco.

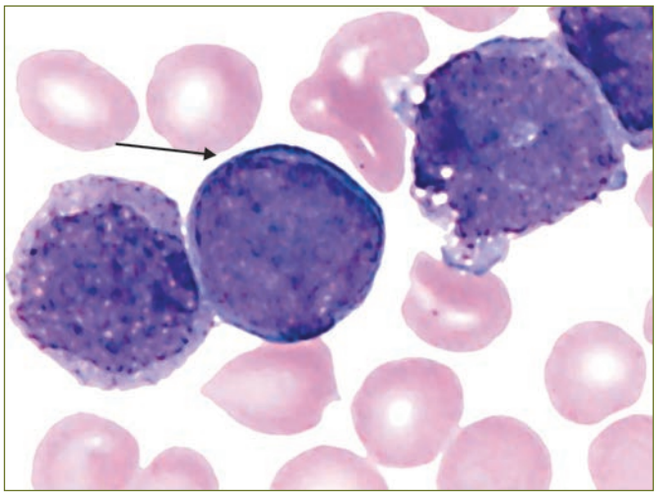


Figura 4.156 LMMC: monócitos displásicos e um blasto (*seta*) (2.000×)

LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÔNICA

No sangue periférico, a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) afeta principalmente idosos do sexo masculino. Apresenta-se com a contagem de blastos inferior a 5%, sendo que a contagem diferencial pode chegar a mais de 80% de células monocitárias (monócitos e raros promonócitos). Algumas células mostram-se displásicas, com grânulos atípicos e vacuolizados (Figuras 4.155 a 4.158). A displasia com uma ou mais linhagens mieloides é frequente na LMMC e o cromosssomo Philadelphia (Ph) está ausente.

Os pacientes podem desenvolver exantema (erupção cutânea); a metade deles tem esplenomegalia. Às vezes, há hipertrofia gengival, fenômenos hemorrágicos e linfonodopatias.

É comum também uma evidente leucocitose com raras células imaturas da linhagem mieloide, além do predomínio de células monocitárias. É frequente a presença de anemia normocítica e normocrômica, plaquetopenia e esplenomegalia.

Geralmente, a medula óssea na LMMC está com hiperplasia das séries granulócitica e monocítica. Esta última representa mais de 20% das células e a contagem de blastos encontra-se entre 5% e 20%.

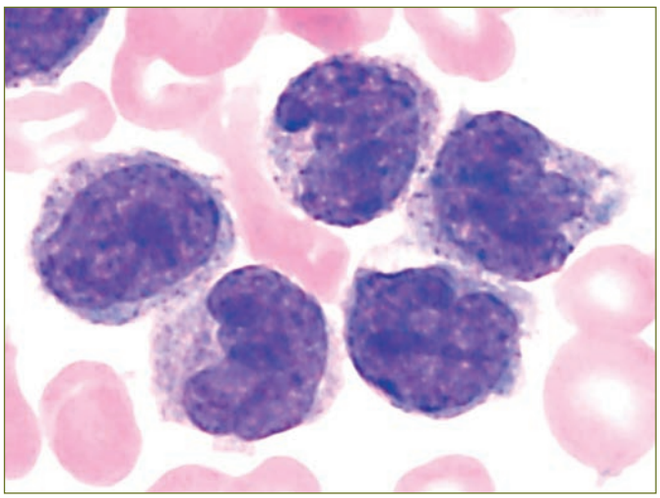


Figura 4.157 LMMC: monócitos displásicos com granulações atípicas (2.000×)

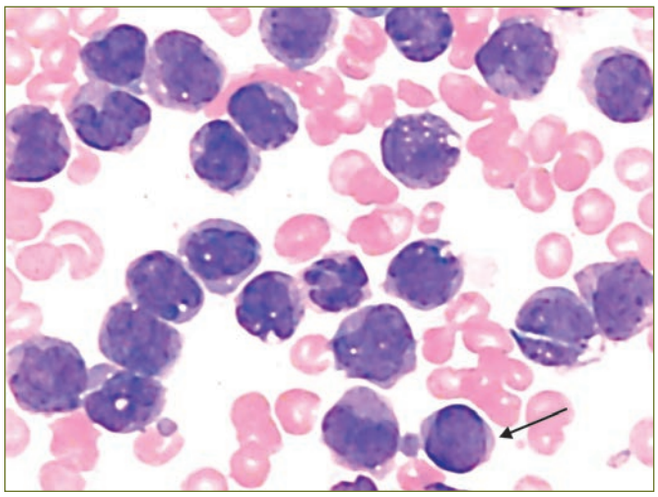


Figura 4.158 LMMC: monócitos displásicos com granulações atípicas e vacuolização e um blasto (*seta*) (800×)

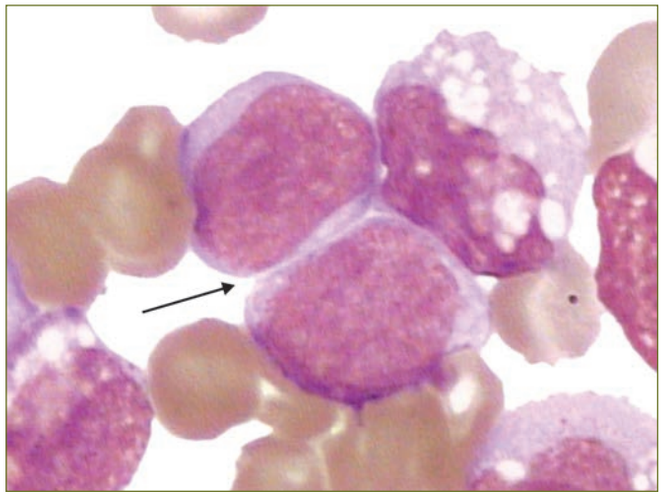


Figura 4.159 LMMJ: blastos (*seta*) e monócitos vacuolizados (2.000×)

O tratamento é difícil, embora a hidroxicarbamida, a mercaptopurina e a etoposida possam ser úteis. A sobrevida mediana é de cerca de 2 anos; um aumento progressivo de blastos na medula é preditivo de mau prognóstico.

LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA JUVENIL

A leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) é um distúrbio hematopoético clonal da infância com proliferação das linhagens monocítica e granulocítica. No entanto, são vistas também alterações nas linhagens eritroides e megacariocíticas. Representa de 2% a 3% de todas as leucemias em crianças, com a estimativa de 1,3 caso em 1 milhão de crianças de 0 a 14 anos.

Os meninos são quase duas vezes mais afetados que as meninas, e o diagnóstico é feito desde 1 mês de vida até a adolescência, porém 75% dos casos ocorrem em crianças com menos de 3 anos de idade. Os sintomas mais comuns são febre, tosse, infecção, fraqueza, palidez, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas e manifestações hemorrágicas. Exantemas cutâneos ocorrem em 40% a 50% dos pacientes. Sintomas de bronquite e tonsilite são observados, aproximadamente, em metade dos casos.

Em geral, a análise do sangue periférico é o mais importante dado para se comprovar o diagnóstico. Leucocitose, anemia e plaquetopenia são frequentes na LMMJ (Figuras 4.159 a 4.160).

A leucocitose é constituída, principalmente, por neutrófilos (inclusive formas imaturas como promielócitos e mielócitos). Blastos podem ocorrer em até 5% das células brancas. Do mesmo modo, eritroblastos podem surgir.

Nenhuma anormalidade imunofenotípica, ou citoquímica, foi relatada na LMMJ.

A medula óssea e o sangue periférico mostram evidente proliferação mielomonocítica. Praticamente em todos os casos, ocorre infiltração leucêmica no baço e no fígado. Embora alguns tecidos possam estar infiltrados, nódulos linfáticos, pele e trato respiratório são sítios comuns de comprometimento.

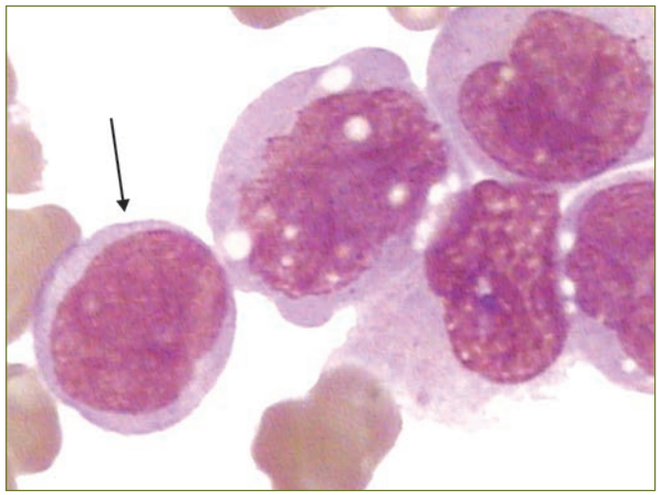


Figura 4.160 LMMJ: blasto (*seta*) e monócitos vacuolizados (2.000×)

O aspirado e a biópsia da medula óssea são hipercelulares com proliferação granulocítica, embora em alguns pacientes precursores eritroides possam constituir quase metade das células na medula óssea. Blastos (incluindo promonócitos) são responsáveis por menos que 20% das células. Não se observam bastonetes de Auer.

A evolução da LMMJ é bastante variável, porém há mau prognóstico se não for tratada. Dos pacientes, 30% deles têm progressão rápida e morrem geralmente dentro de um ano após o diagnóstico. O tempo médio de sobrevida varia de 5 meses a 4 anos.

A maioria das crianças morre por algum tipo de falência de órgãos, como a falha respiratória pela infiltração leucêmica. Relativamente poucos pacientes evoluem para leucemia aguda. Embora a quimioterapia possa beneficiar alguns pacientes, a resposta global é ruim e, atualmente, o transplante de medula óssea é a única terapia que demonstrou real melhora no tempo de sobrevida.

TROMBOCITEMIA ESSENCIAL

É um distúrbio mieloproliferativo crônico caracterizado pela proliferação de megacariócitos na medula óssea, que promove uma contagem de plaquetas superior a 600.000 plaquetas/mm^3. Entretanto, é comum observar nesses pacientes contagens que podem ultrapassar 2.000.000 plaquetas/mm^3.

A trombocitemia essencial (TE), também conhecida como trombocitemia idiopática, trombofilia essencial ou trombocitose essencial, é uma doença rara que apresenta a idade média de diagnóstico entre 50 e 60 anos. Além do hemograma com a plaquetose, o diagnóstico é confirmado por mielograma, biopsia de medula óssea e citogenética. Os mecanismos que levam à trombocitose ainda não são conhecidos. Estudos demonstram que ocorre produção anormal quantitativa e qualitativamente de plaquetas oriundas de um clone de megacariócitos anormais.

Clinicamente, a TE pode apresentar: perda de peso, discreta anemia, cefaleia, febre, sudorese, prurido, ataques isquêmicos transitórios, esplenomegalia, angina, priapismo, abortamento no primeiro trimestre da gravidez, manifestações trombóticas e hemorragias. Contudo, mais de 50% dos pacientes são assintomáticos ao diagnóstico, e a primeira suspeita ocorre quando se observa plaquetose no hemograma de rotina ou surge alguma manifestação de oclusão vascular.

Na prevenção de fenômenos trombóticos, o ácido acetilsalicítico é a terapia antiplaquetária mais utilizada na TE, já que esse medicamento tem o poder de inibir a produção de troboxano A2, substância presente nos grânulos das plaquetas com a função de ativação e agregação (agente agregante). No tratamento citorredutor, os fármacos mais comumente utilizados são a hidroxiureia, a anagrelide e o interferon.

Nos pacientes com TE com história de trombose e isquemia, a hidroxiureia é o fármaco de primeira linha desde 1980. Esse medicamento é também indicado em pacientes assintomáticos com risco de complicações hemorrágicas, como aqueles com idade avançada, superior a 60 anos. Isso porque ela inibe o crescimento celular pela inibição da enzima ribonucleotídio difosfato redutase. Entretanto, o efeito supressor do fármaco não é específico para as plaquetas, o que resulta também em redução da mielopoese e da eritropoese.

A anagrelide pode reduzir a contagem de plaquetas em 50%, ou a níveis abaixo de 600.000 plaquetas/mm^3, com resposta de até 90% nos pacientes tratados com essa medicação. Sua ação de inibir a enzima nucleotídio fosfodiesterase cíclica interfere na agregação plaquetária e na maturação e na segmentação dos megacariócitos.

No esfregado do sangue periférico dos pacientes com TE, observa-se plaquetose com uma evidente alteração de tamanho e estrutura das plaquetas, além do surgimento de macroplaquetas e plaquetas gigantes (Figuras 4.161 e 4.163).

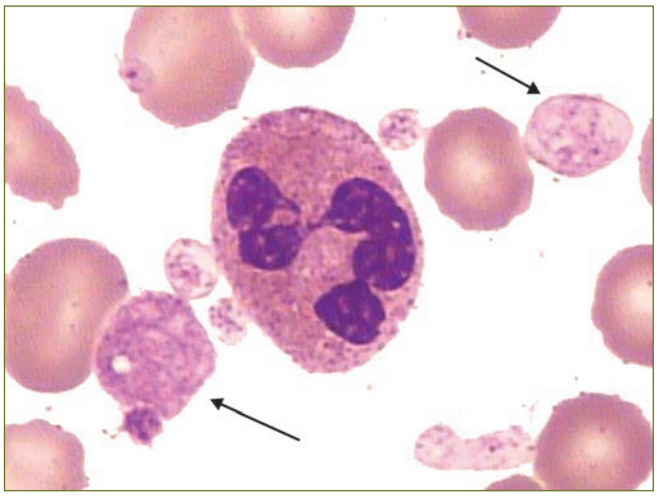


Figura 4.162 Trombocitemia essencial: macroplaquetas (*setas*) (2.000×)

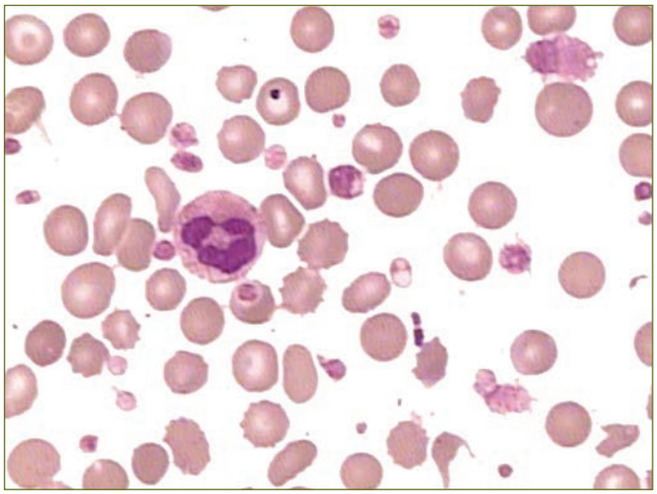


Figura 4.161 Trombocitemia essencial: plaquetose com evidente alteração de tamanho e estrutura nas plaquetas (1.200×)

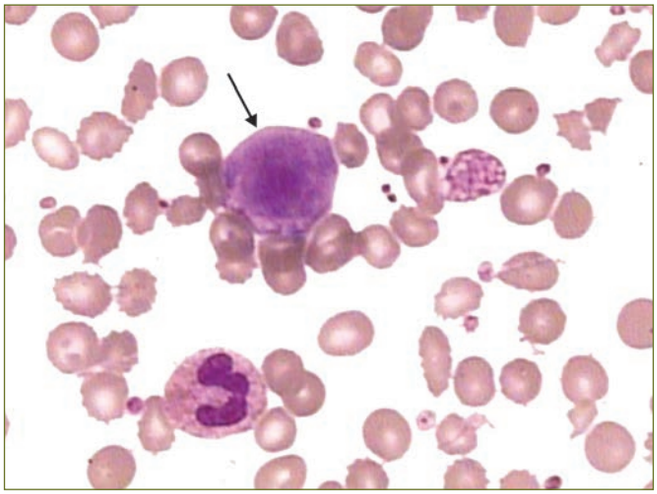


Figura 4.163 Trombocitemia essencial: plaqueta gigante (*seta*) (1.200×)

SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são raras na infância e frequentes em pacientes com mais de 50 anos de idade, acometendo mais homens do que mulheres. As SMD constituem um grupo de doenças neoplásicas clonais das células-tronco hematopoéticas multipotentes, com distúrbio na proliferação, maturação e apoptose celular, o que leva à produção ineficiente das três linhagens de células da medula óssea. Um aspecto dessas doenças é a hematopoese ineficaz, de modo que citopenias quase sempre acompanham uma medula óssea de celularidade normal ou aumentada. Além dessa característica, as SMD podem apresentar graus variados de risco da evolução para leucemia aguda, o que lhe valeu a designação errônea de "pré-leucemia". Esse termo é impróprio, pois nem sempre há evolução para leucemia aguda.

A patogênese das SMD não é bem definida, mas se presume que se iniciem com a ocorrência de dano genético a uma célula progenitora hematopoética multipotente. Nas últimas décadas, tem ficado mais evidente que indivíduos submetidos à radioterapia e à quimioterapia ou expostos cronicamente a fatores ambientais (radiação, benzeno) têm maior risco de desenvolver as SMD.

A sintomatologia depende da linhagem hemotopoética acometida, sendo mais frequentes os sinais e sintomas relacionados à anemia, geralmente normocítica e normocrômica,. No entanto, muitas vezes ela pode ser macrocítica. Perda de peso e astenia podem ser relatadas. Como os neutrófilos, os monócitos e as plaquetas estão quase sempre hipofuncionantes, infecções espontâneas e manifestações hemorrágicas (petéquias, equimoses, gengivorragia, epistaxe) podem ocorrer desproporcionalmente à gravidade das citopenias.

No sangue periférico, a pancitopenia é um achado frequente. Em geral, os eritrócitos são macrocíticos, ocasionalmente hipocrômicos, ocorrendo anisopoiquilocitose e pontilhado basófilo; eritroblastos podem estar presentes. A contagem de reticulócitos é baixa. Com frequência, os granulócitos estão diminuídos, hipersegmentados (polilobulia) com núcleos bizarros e não apresentem granulação (hipogranúlicos). Muitas vezes, há alterações da segmentação nuclear (núcleo único ou bilobulado) semelhantes às da anomalia de Pelger-Huët, designadas pseudo-Pelger-Hüet e assincronia nuclear citoplasmática (conforme as diferentes etapas de maturação entre o citoplasma e o núcleo da mesma célula). O sangue periférico pode apresentar macroplaquetas e plaquetas com ausência de grânulos (Figuras 4.164 a 4.167).

Além da história clínica, do exame físico e do hemograma, o diagnóstico da SMD envolve o estudo da medula óssea (citologia, citoquímica e histologia). A percentagem de blastos é um fator prognóstico isolado muito importante na SMD.

Na medula óssea, geralmente a celularidade está aumentada, mas diminuída em 20% dos casos. A série eritrocítica pode apresentar hiperplasia com diseritropoese, hemoglobinização anômala e dissociação de maturação entre núcleo e citoplasma, além de serem observados eritroblastos multinucleados. Devem sempre ser avaliados o ferro medular e a presença de sideroblastos em anel.

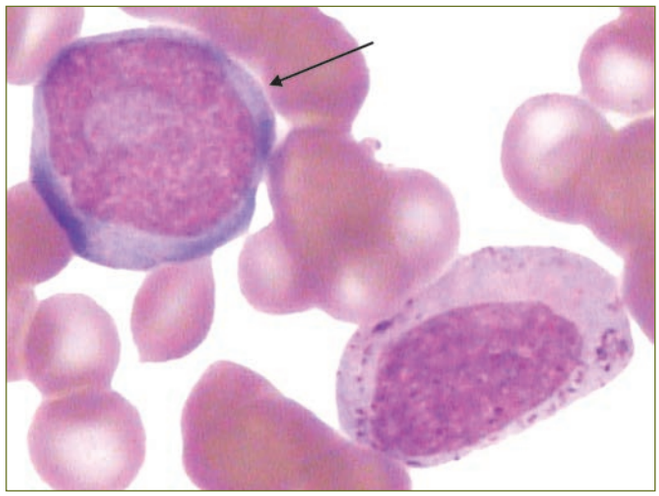
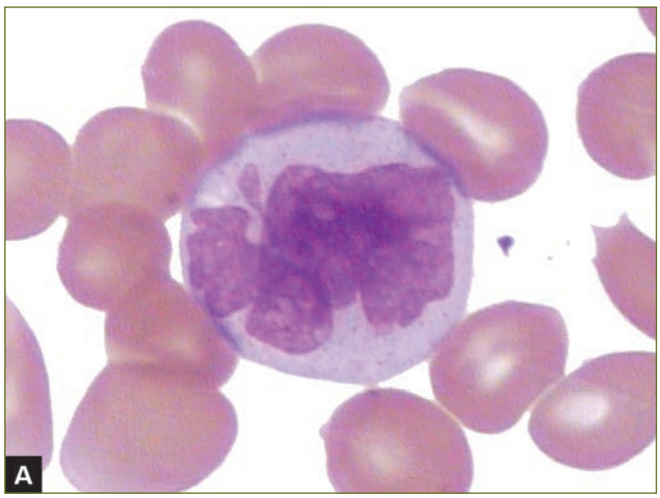


Figura 4.164 SMD: blasto (*seta*) e granulócito assincrônico (2.000×)



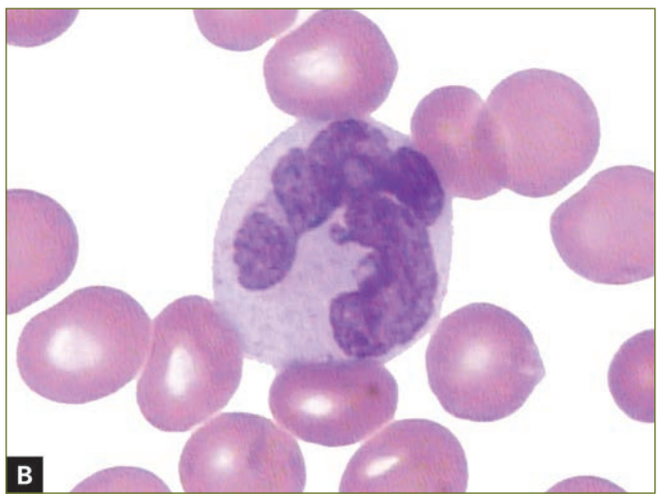


Figura 4.165 (**A** e **B**) SMD: outras formas de monócitos displásicos (2.000×)

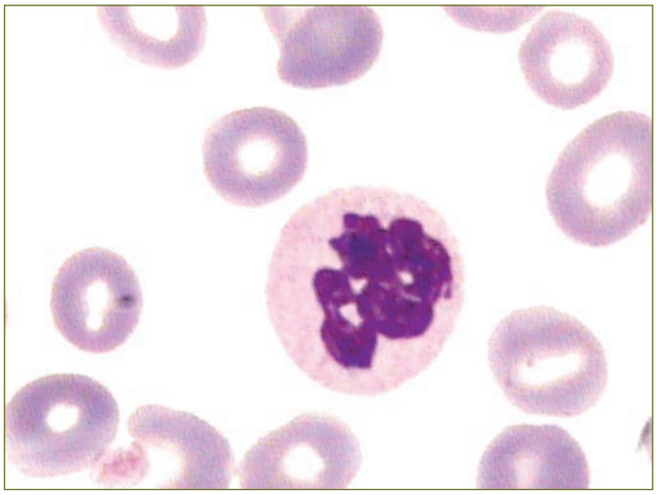


Figura 4.166 SMD: blasto (geralmente pequeno e redondo), um granulócito e um bastonete hipogranúlico (*seta*) (2.000×)

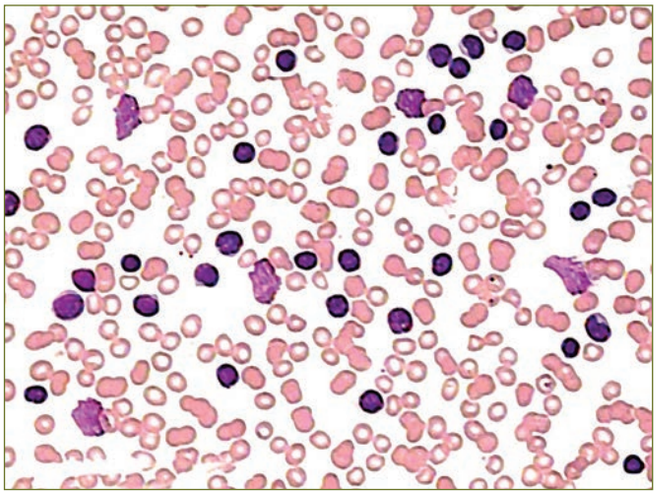


Figura 4.167 SMD: neutrófilo com polilobulia e hipogranúlico (2.000×)

Os precursores granulocíticos mostram granulação primária e secundária defeituosas. São frequentes células de distinção entre mielócitos agranulares, monócitos ou promonócitos. A série megacariocítica costuma ser hipocelular. A dismegacariocitopoese da SMD evidencia-se pela presença de megacariócitos displásicos, os quais podem ser de três tipos: micromegariócitos, megacariócitos grandes mononucleados e megacariócitos com núcleos múltiplos ou separados.

Alterações genéticas clonais podem ser detectadas em 30% a 50% dos casos de SMD primária (*de novo*) e em mais de 80% das SMD secundárias. As anormalidades citogenéticas mais frequentemente observadas são deleção do braço longo do cromossomo 5(5q-); trissomia do cromossomo 8 (+8); monossomia do cromossomo 7(-7); deleção do braço longo do 11(11q-), do cromossomo 20(20q-) e do cromossomo 7(7q-); e deleção do braço curto do cromossomo 12(12p-).

A citogenética persiste como o método de escolha para a detecção de anomalias clonais na SMD. A hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) é um método citogenético molecular que usa sondas de DNA complementares ao cromossomo ou à região cromossômica que se deseja estudar. Essas sondas são marcadas com substância fluorescente, a fim de possibilitar sua identificação quando analisadas. A vantagem desse método é o fato de poder avaliar as células tanto durante a intérfase quanto durante a metáfase. Com isso, um maior número de células pode ser avaliado, aumentando a chance de detecção de um clone anormal. A desvantagem é que, como são usadas sondas específicas para um determinado cromossomo, apenas a anormalidade pesquisada poderá ser detectada. Como é mais sensível que a citogenética clássica, o FISH tem sido utilizado para o acompanhamento dos pacientes com SMD, o que possibilita tanto a monitoração de expansão do clone neoplásico quanto a detecção precoce de recidivas após o tratamento. No entanto, o FISH e a citogenética não são métodos excludentes, mas, quando associados, podem aumentar a detecção de alterações.

Algumas síndromes clínicas têm sido relacionadas com determinadas alterações do cariótipo. Entre as anemias refratárias, a mais bem definida é a síndrome 5q-, , que ocorre predominantemente no sexo feminino, sendo caracterizada por uma anemia macrocítica dependente de transfusão, além da contagem aumentada de plaquetas. A lesão citogenética corresponde a uma deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5, acometendo a região 5q31.1.

Com a característica de citopenia no sangue periférico e hiperplasia na medula óssea, as SMD cursam com hematopoese irregular e ineficaz causadas pelas alterações de proliferação, maturação e apoptose celular. Esses distúrbios hematopoéticos estão classificados em quatro tipos, de acordo com a deficiência medular:

- **Anemia refratária (AR)**: no sangue periférico, observam-se anemia e blasto abaixo de 1%. Na medula óssea, a celularidade é variável com presença de atipias e contagem de blastos inferior a 5%.
- **Anemia refratária com sideroblasto em anel (ARSA)**: no sangue periférico, é comum anemia com contagem de blasto inferior a 1%. Na medula óssea, observam-se sideroblastos em anel, com depósitos granulares perinucleares de ferro (formando um colar), identificados por meio de reação citoquímica do azul da Prússia (ou de Perls), em mais de 15% de todos os eritroblastos.
- **Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)**: no sangue periférico, são vistas uma pancitopenia e uma contagem de blastos abaixo de 5%. Na medula óssea, a contagem de blastos está entre 5% e 20%, e são comuns atipias e hipercelularidade.
- **Anemia refratártia com excesso de blastos, em transformação (AREB-t)**: no sangue periférico, além da pancitopenia, a contagem de blastos está superior a 5%. Na medula óssea, os blastos estão com contagem entre 21% e 30% e são comuns bastonetes de Auer.

Na SMD, tanto as manifestações clínicas e laboratoriais são heterogêneas quanto a evolução dos pacientes são também muito variadas. Há pacientes com AR que vivem por mais de 10 anos, enquanto outros sofrem com insuficiência medular

grave, evolução agressiva ou transformação precoce em LMA. Esta variabilidade dificulta bastante a escolha da conduta terapêutica a ser tomada em cada caso.

Na tentativa de estabelecer quais pacientes têm maior ou menor probabilidade de evolução e sobrevida, foi desenvolvido o International Prognostic Scoring System (IPSS) por Greenberg et al. (1997), que se baseia na alteração citogenética, nas citopenias periféricas e na porcentagem de blastos na medula óssea. Assim, pacientes com escore baixo têm maior sobrevida e podem ter tratamentos específicos.

De modo geral, pacientes com menos de 50 anos de idade, citopenias graves ou excesso de blastos, e que têm doador compatível, são candidatos a transplante de medula óssea. Pacientes mais velhos ou com comorbidade relevante são candidatos às várias formas de tratamento de suporte, como transfusão de componentes sanguíneos, quelantes de ferro, eritropoetina, corticoides, agentes diferenciadores celulares e citoprotetores. O tratamento visa, principalmente, ao controle das complicações (infecções, anemia e hemorragia).

Atualmente, tem-se empregado cada vez mais o transplante de medula óssea alogênico, tentando-se erradicar os clones totipotentes anômalos do paciente e inserindo clones normais de um doador compatível. Recomenda-se a quimioterapia a pacientes com blastos medulares acima de 10%, com idade abaixo de 60 anos, sem doador compatível e com bom estado geral para o tratamento.

DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS

LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA

A leucemia linfoide crônica (LLC) é mais comum em homens do que em mulheres, sendo a idade de maior incidência acima dos 65 anos. É uma doença rara antes dos 50 anos de idade.

Nos países ocidentais, a LLC representa cerca de 30% de todos os casos de leucemias (cinco episódios a cada 1 milhão de habitantes), porém é baixa a incidência da doença na Ásia. No Brasil, surgem aproximadamente 1,5 mil casos novos por ano de LLC.

A LLC tem origem nos linfócitos B relativamente maduros, com fraca expressão de imunoglobulina IgM ou IgD de superfície. Os linfócitos na LLC invadem órgãos linfoides, como o baço e os linfonodos, além de quase todas as partes do corpo, como sangue periférico, medula óssea, pele e meninge, devido à sobrevida prolongada com diminuição da apoptose.

Geralmente, a doença é assintomática e muitos casos são diagnosticados em um hemograma de rotina. No entanto, podem surgir sintomas como cansaço e perda de peso. Nos estágios tardios, esplenomegalia e hepatomegalia são frequentes, além de possíveis sinais e sintomas de anemia. Pacientes com trombocitopenia podem ter sinais purpúricos.

O aumento simétrico de lifonodos cervicais, axilares e inguinais é o sinal clínico mais frequente. Os linfonodos costumam ser isolados e não dolorosos.

A imunossupressão, resultante de hipogamaglobulinemia e disfunção da imunidade celular, é um problema significativo. Precocemente, no curso da doença, predominam as infecções bacterianas. Na doença avançada, surgem infecções fúngicas e virais, como o herpes-zóster.

Há casos de LLC que evoluem para o linfoma difuso de grandes células B: essa evolução é conhecida como "síndrome de Richter". Esta é acompanhada por febre, sudorese, anemia, trombocitopenia, linfadenopatia e um mau prognóstico de, mais ou menos, 6 anos de vida.

A etiologia da LLC ainda é desconhecida, porém há casos de predisposição genética. Pela medula óssea e pelo sangue periférico, pode ser feito o diagnóstico da LLC e, em alguns casos, é feita a biópsia do gânglio linfático e do baço. A biologia molecular e a citogenética definem a doença.

A aspiração da medula óssea mostra substituição de células mieloides normais por linfócitos. Os linfócitos compreendem 25% a 95% de todas as células. A biópsia de medula óssea mostra que a infiltração linfocítica é nodular, difusa e intersticial.

A imunofenotipagem dos linfócitos mostra que são células B (CD19 na superfície) expressando fracamente imunoglobulina de superfície (IgM ou I gD). A proliferação é monoclonal, pois há expressão de apenas um tipo de cadeia leve. Caracteristicamente, as células são positivas para CD5 e CD23 de superfície, mas negativas para CD79b e FMC7.

As quatro anomalias cromossômicas mais comuns são deleção de 13q14, trissomia 12, deleções em 11q23 e anomalias estruturais de 17q envolvendo o gene p53. Essas anomalias têm significado prognóstico.

No sangue periférico, o achado mais característico é a linfocitose persistente de linfócitos maduros, pequenos com núcleos redondos, cromatina densa e com pouco citoplasma (Figuras 4.168 a 4.171).

Com a progressão da doença, ocorrem leucocitose e aumento do número de linfócitos, além de anemia e plaquetopenia, que são muito comuns. Frequentemente, são vistos restos celulares chamados de *smudge cell* ou manchas de Gumprecht, que nada mais são do que artefatos por danos produzidos aos linfócitos na hora da confecção do esfregaço sanguíneo, resultado da fragilidade da célula neoplásica.

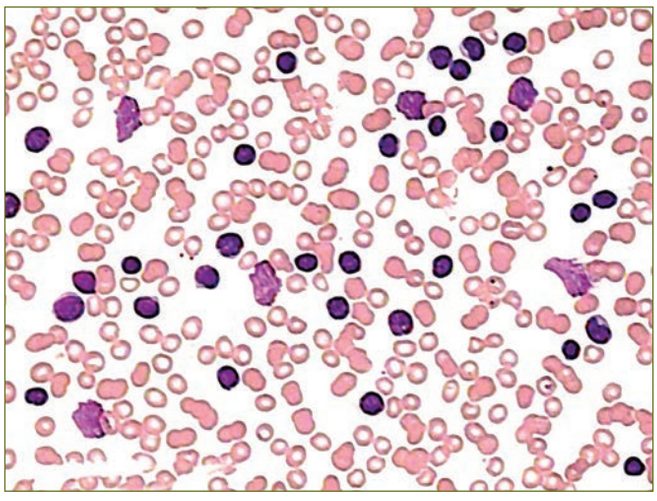


Figura 4.168 LLC: linfócitos maduros e manchas nucleares (400×)

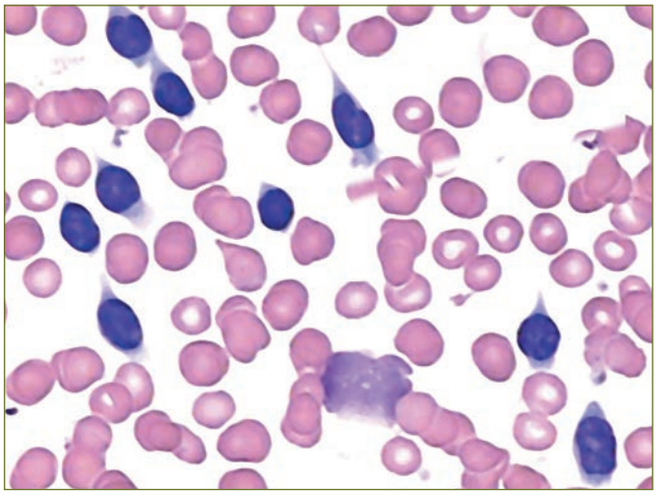


Figura 4.169 LLC: linfócitos maduros alongados (vistos em doenças linfoproliferativas) (800×)

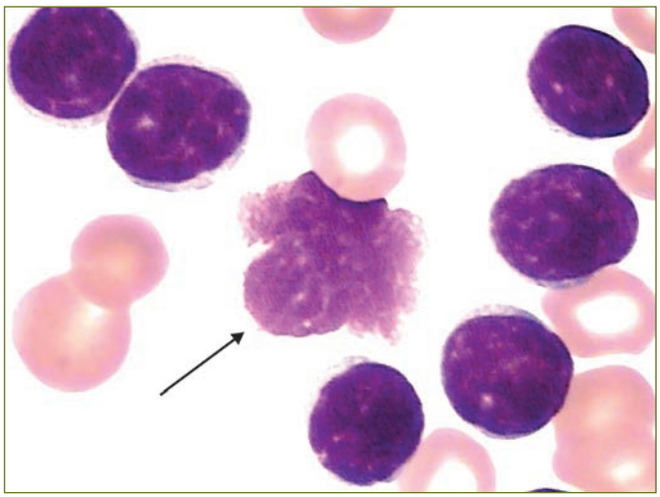


Figura 4.170 LLC: linfócitos maduros e uma mancha nuclear (Gumprecht) (*seta*) (2.000×)

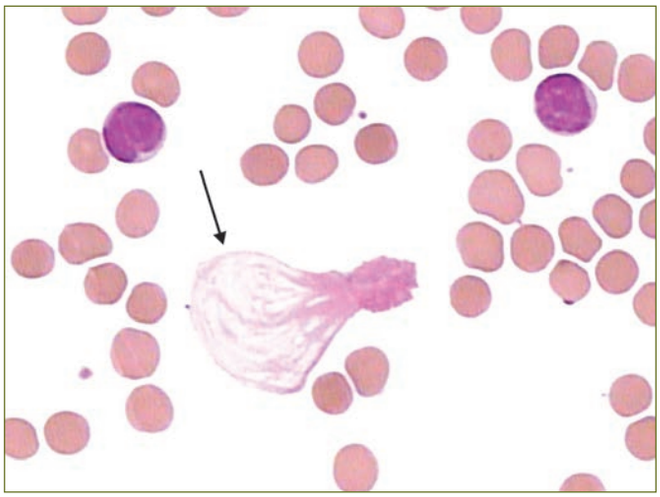


Figura 4.171 Leucemia linfoide crônica – célula em "cesta" (*seta*) – mancha nuclear (800×)

São comuns síndromes de autoimunidade contra células do sistema hematopoético. A anemia hemolítica é a mais frequente e pode ser desencadeada pelo tratamento com fludarabina ou pela própria doença. No entanto, trombocitopenia, neutropenia e aplasia eritroblástica pura também podem ocorrer. O teste de Coombs pode se apresentar positivo em até 35% dos casos.

A LLC divide-se em três grupos:

- **LLC típica ou clássica**: os linfócitos maduros são a maioria; presença de raros ou nenhum prolinfócitos ou linfócitos atípicos.
- **LLC com transformação prolinfocítica**: a característica principal é a presença de 11% a 54% de prolinfócitos no sangue periférico.
- **Mista**: até 10% de prolinfócitos e frequentemente linfócitos atípicos.

Curas são raras na LLC. Por isso, um tratamento conservador é sempre preferido. Este tem o objetivo de controlar os sintomas, não de normalizar as contagens sanguíneas. De fato, a quimioterapia feita muito cedo pode diminuir em vez de aumentar a expectativa de vida. Muitos pacientes não requerem tratamento.

Casos de organomegalias incomodativas, episódios hemolíticos e supressão da medula óssea pela infiltração linfoide têm indicação para o tratamento. No tratamento da LLC, os medicamentos mais utilizados são a fludarabina, os anticorpos monoclonais (campath-1, rituximab), a clorambucila e os corticosteroides (prednisona). Outras formas de tratamento são a radioterapia (útil na diminuição do volume de grupos de linfonodos que não responderam à quimioterapia), a ciclosporina, a esplenectomia, a reposição de imunoglobulinas e o transplante de medula de células-tronco – este último ainda em fase experimental.

LEUCEMIA PROLINFOCÍTICA DE CÉLULAS B

A leucemia prolinfocítica é uma doença rara, com proliferação clonal de linfócitos maduros e pode ocorrer em linfócitos B e linfócitos T, embora 80% dos casos sejam de linfócitos B. Com etiologia desconhecida, a leucemia prolinfocítica de células B (LPL-B) é quatro vezes mais comum no homem que na mulher. Na maioria dos casos, surge a partir dos 70 anos de idade.

A LPL-B é diferenciada da LLC-B com transformação pela quantidade de prolinfócitos superior a 55% no sangue periférico. Outra característica da LPL-B é a leucocitose geralmente superior a 100.000 leucócitos/mm^3. A anemia é normocítica e normocrômica, com hemoglobina abaixo de 11g/dL e as plaquetas geralmente estão com contagens menores que 100.000 leucócitos/mm^3.

Na leucemia prolinfocítica de células B, não costuma haver linfoadenomegalia, sendo bastante frequentes fadiga, fraqueza, perda de peso, plenitude gástrica e esplenomegalia. Esporadicamente, podem ocorrer complicações cardiopulmonares devido à leucostase associada a acentuada leucocitose.

Na maioria dos casos, a doença é agressiva, com piora progressiva. Nota-se acentuado aumento de prolinfócitos, atingindo nos estágios finais da doença valores acima de 500.000 células/μL.

A morfologia do prolinfócito é bastante característica. Apresenta-se com o tamanho celular maior que o linfócito da LLC e tem o núcleo arredondado com um grande e único nucléolo. Além disso, a cromatina é relativamente condensada e a relação núcleo/citoplasma é maior que na LLC (Figuras 4.172 a 4.175).

As células da LPL-B expressam CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b e FMC7. CD5 e CD23 são positivos em apenas 20% a 30% e 10% a 20% dos casos, respectivamente.

A resposta ao tratamento é, em geral, insatisfatória, com sobrevida média de três anos. Contudo, alguns pacientes podem apresentar evolução indolente, com sobrevida longa.

Não há fatores prognósticos bem estabelecidos. Nota-se, porém, que a anemia com hemoglobina abaixo de 11g/dL e os linfócitos acima de 100.000/μL são fatores de mau prognóstico.

A LPL-B responde de modo ineficaz ao tratamento comumente empregado na LLC – clorambucila ou ciclofosfamida, associadas ou não à prednisona. As respostas a vários esquemas de tratamento, em geral de remissão completa, têm sido relatadas em casos isolados e, portanto, sem valor casuístico. A esplenomegalia é medida adjuvante no tratamento da LPL-B, pois apresenta melhora nas contagens do sangue periférico, bem como na qualidade de vida.

TRICOLEUCEMIA

A tricoleucemia é uma leucemia indolente e rara que representa apenas de 2% a 4% de todas as leucemias. Era conhecida anteriormente como reticuloendoteliose leucêmica. O nome tricoleucemia, ou leucemia de células cabeludas, vem da morfologia dos linfócitos leucêmicos que apresentam projeções citoplasmáticas finas semelhantes a fios de cabelo.

Como toda doença linfoproliferativa, ela tem um acúmulo celular pela longa sobrevida das células leucêmicas, e não pela atividade proliferativa, que é baixa. A incidência é maior nos homens (cerca de quatro vezes mais que nas mulheres) e a

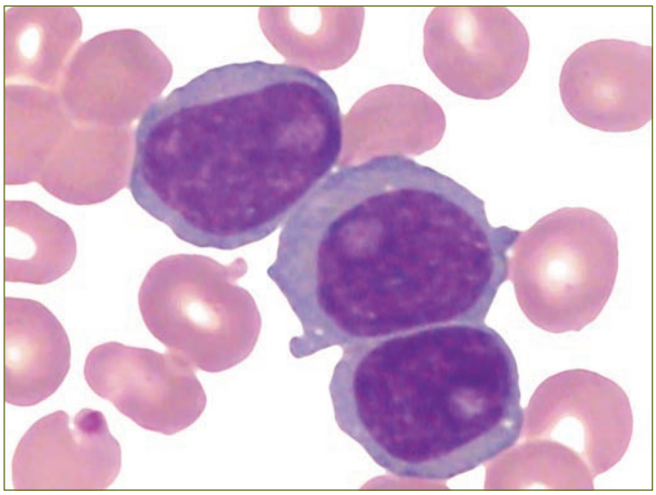


Figura 4.172 LPL-B: prolinfócitos (destaque para o nucléolo grande e único) (2.000×)

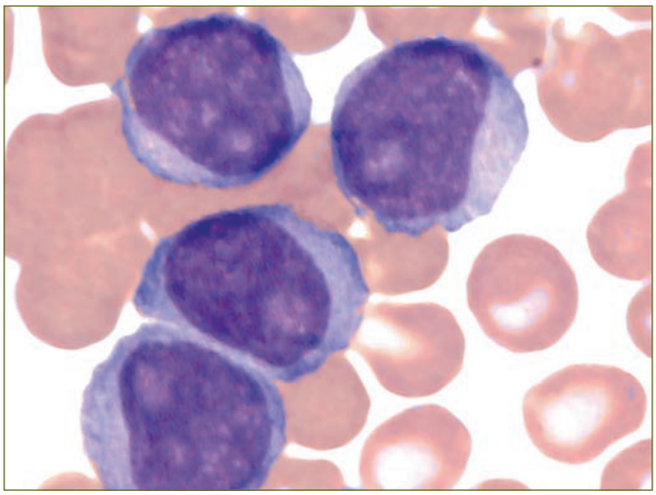


Figura 4.174 LPL-B: prolinfócitos (destaque para o nucléolo grande e único) (2.000×)

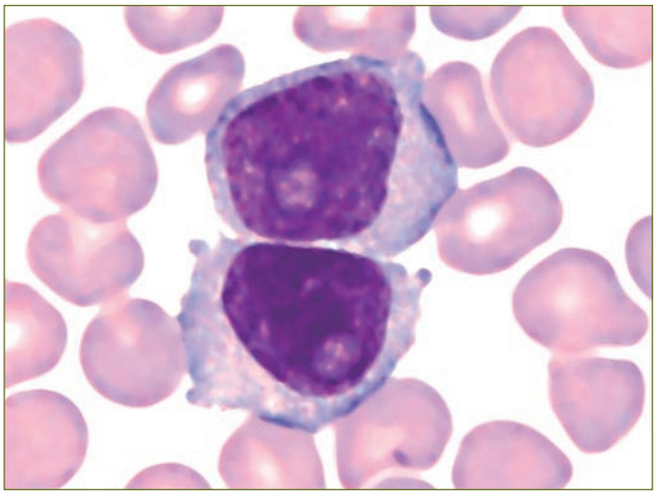


Figura 4.173 LPL-B: prolinfócitos (destaque para o nucléolo grande e único) (2.000×)

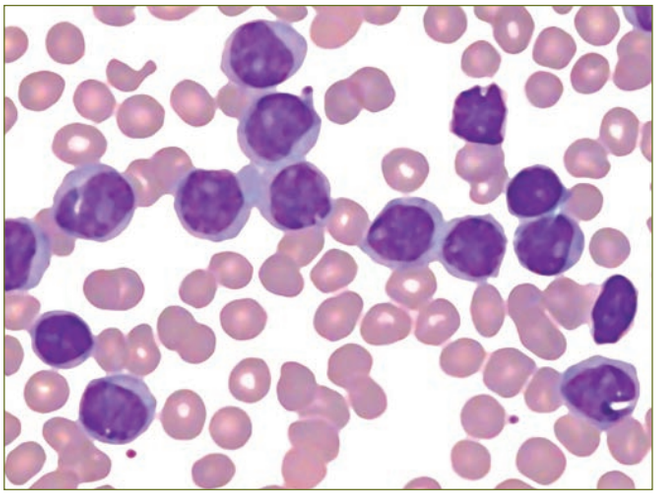


Figura 4.175 LPL-B: prolinfócitos (destaque para o nucléolo grande e único) (800×)

faixa etária mais frequente do surgimento da doença é a partir dos 60 anos de idade.

Clinicamente, os sinais mais comuns são os relacionados com pancitopenia, caracterizados por sintomas associados à anemia (macrocítica) e às manifestações hemorrágicas decorrentes da plaquetopenia, além de monocitopenia evidente. Como resultado da neutropenia, as infecções bacterianas tornam-se mais comuns no decorrer da doença.

Uma evidente esplenomegalia é comum na tricoleucemia, porém o comprometimento ósseo é visto apenas em alguns casos. As células leucêmicas da tricoleucemia são duas vezes maiores que os linfócitos normais, exibindo citoplasma irregular característico, com projeções citoplasmáticas finas e núcleo excêntrico sem nucléolo (Figuras 4.176 e 4.177). A medula óssea é hipercelular na maioria dos pacientes, com infiltração por células leucêmicas que pode ser difusa ou focal.

Os critérios obrigatórios para o diagnóstico da tricoleucemia são fosfatase ácida tartarato-resistente positiva e célula típica no sangue periférico ou na medula óssea. Além disso, há os critérios confirmatórios: biópsia de medula óssea mostrando o infiltrado por células típicas e fibrose de reticulina e imunofenótipo típico-proliferação B monoclonal com CD11c+, CD25+ e CD103+.

Cerca de 10% dos pacientes são assintomáticos e podem ser observados por meses ou mesmo anos após o diagnóstico. No entanto, com infecções graves, sintomas como febre, sudorese noturna, fadiga, esplenomegalia, citopenias, níveis baixos de hemoglobina (menos de 11g/dL ou contagens de plaquetas com menos de 100.000 células/μL) constituem critérios (embora não unanimemente aceitos) para o início do tratamento. Quando houver indicação para iniciar o tratamento, os análogos das purinas são a primeira escolha, entretanto o interferon ou a esplenectomia já foram as terapias de escolha para esta doença.

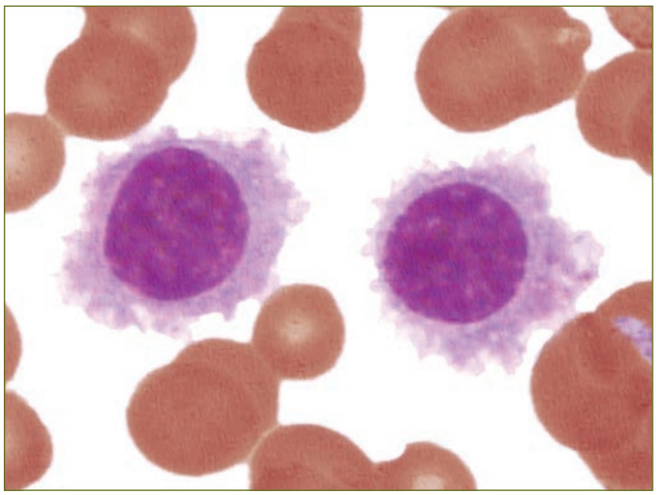


Figura 4.176 Tricoleucemia: tricoleucócitos com projeções filamentosas citoplasmáticas (2.000×)

DISTÚRBIO LINFOCÍTICO DE GRANDES CÉLULAS GRANULARES

As células exterminadoras naturais (NK – *natural killer cells*) são vistas em pequena percentagem no sangue periférico (cerca de 15% de todos os linfócitos), porém esse nível de células NK pode se elevar em alguns distúrbios como infecções virais e aberrações imunes. Contudo, após o distúrbio, os níveis de células NK voltam ao normal.

Alguns pacientes desenvolvem um aumento inexplicável de células NK com "manutenção", o que é chamado de distúrbio linfocítico de grandes células granulares – NK (LGL). A LGL "mantida" evolui por décadas e é estável e, como os linfócitos NK da LGL assemelham-se às suas maturações normais, o diagnóstico diferencial fica mais fácil.

A esplenomegalia e a artrite reumatoide são os sintomas mais frequentes da LGL. No sangue periférico, os dados mais comuns são evidente neutropenia, aplasia de células vermelhas e evidente aumento no número de células NK (Figuras 4.178 e 4.179).

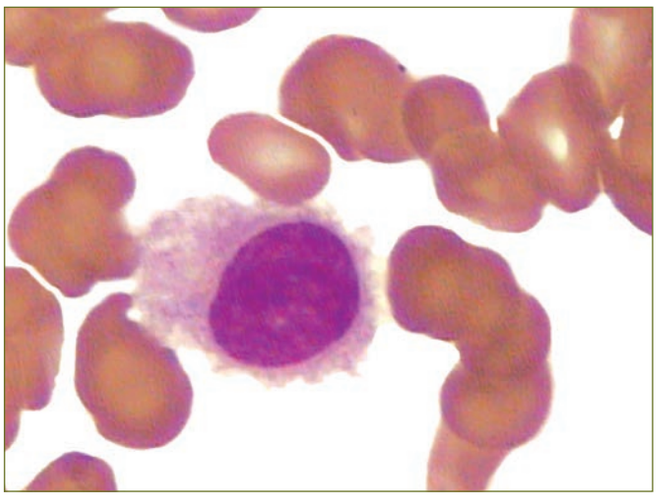


Figura 4.177 Tricoleucemia: tricoleucócito com projeções filamentosas citoplasmáticas (2.000×)

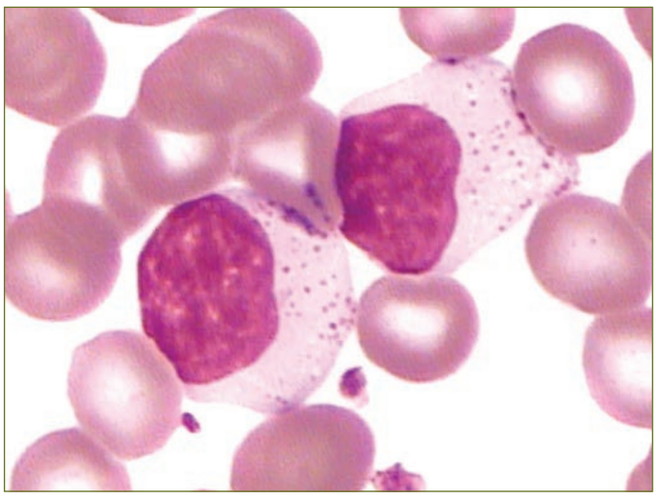


Figura 4.178 LGL: linfócitos NK (800×)

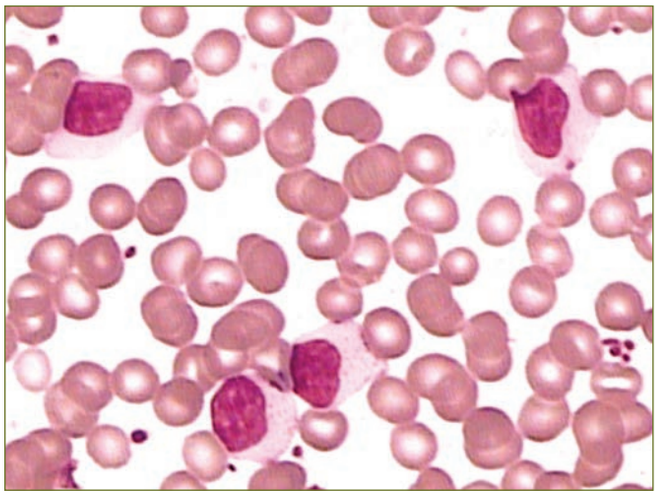


Figura 4.179 LGL: linfócito NK (2.000×)

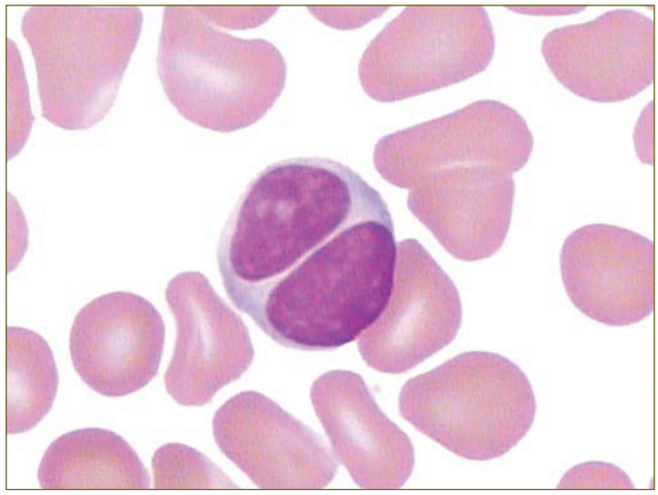


Figura 4.180 PPBL: linfócito binucleado (2.000×)

Geralmente, o exame da medula óssea não é necessário. Porém, se realizado, pode mostrar infiltração da medula óssea, o que provoca fibrose reticular. Em raros casos de LGL, há transformação para leucemia aguda.

A célula NK tem núcleo redondo com cromatina densa e nucléolo pouco visível e o citoplasma é azul-acinzentado com grânulos azurófilos. Na LGL, os marcadores CD3, CD2, CD5, CD8, CD16 e CD57 são classicamente expressados pela imunofenotipagem.

O tratamento pode não ser necessário, mas, caso seja, esteroides, ciclofosfamida, ciclosporina e metotrexato podem aliviar a neutropenia. Fatores estimuladores de colônias granulocítico-macrofágicas (G-CSF e GM-CSF) têm sido usados em casos associados à neutropenia.

LINFOCITOSE PERSISTENTE POLICLONAL DE CÉLULAS B

A linfocitose persistente policlonal de células B (PPBL) é uma condição rara com etiologia desconhecida e classificada como benigna, porém alguns autores discordam, pois alguns pacientes com PPBL desenvolveram doenças como câncer sólido, proliferação policlonal e linfomas malignos, assim como linfoma difuso de grandes células B. Esta linfocitose persistente ocorre principalmente nas mulheres entre 25 e 65 anos, com idade média de 40 anos – quase todas fumantes. Pode ocorrer em homens e em mulheres não fumantes, porém é algo muito raro.

A PPBL é uma anomalia do sistema imunológico humano que apresenta IgM policlonal alto, IgA e IgG baixos e o fenótipo HLA DR 7. Em um estudo com 111 pacientes portadores de PPBL, apenas 10% apresentaram sinais clínicos, como: esplenomegalia, linfadenopatia e síndrome da fadiga crônica.

No sangue periférico, observa-se uma linfocitose com contagem absoluta entre 5.000 e 15.000 (ng/mL). Além disso, a presença de linfócitos bilobulados e binucleados é bastante característica nesta condição, assim como podem ser vistos raros ou alguns linfócitos atípicos (Figuras 4.180 e 4.181). A expressão dos marcadores tumorais na PPBL é pan-B, positivo para CD19, CD20 e CD22, com ausência ou diminuição dos CD5, CD10 e CD23. Tais marcadores podem também expressar os CD25, CD11c e FMC7.

DOENÇAS DAS CÉLULAS PLASMÁTICAS

MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo ocorre com maior frequência em homens do que em mulheres, sendo a idade média do surgimento da doença de 62 anos. A incidência da doença em pacientes negros é o dobro em relação aos brancos. O mieloma múltiplo representa 1% de todos os casos de câncer, e 10% de todos os casos de doenças hematológicas.

O plasmócito do centro pós-germinal é a célula mielomatosa da doença, que sofreu mudança da classe de imunoglobulina e hipermaturação somática, secretando a paraproteína presente no soro. Tais células naturalmente se localizam na medula óssea e o mesmo acontece com as células tumorais.

O crescimento desordenado de células plasmáticas maduras e imaturas com substituição medular é a melhor definição para a doença (anteriormente chamada de leucemia de células imortais). Durante o desenvolvimento da doença, observa-se um aumento da célula óssea osteoclasto, célula produtora de enzimas que degradam a matriz óssea mineralizada, gerando um aumento nas lesões líticas dos pacientes portadores de mieloma múltiplo.

No mieloma múltiplo, as imunoglobulinas séricas estão geralmente alteradas (pico monoclonal). A eletroforese de proteínas mostra o aspecto em "espiga", característico do mieloma múltiplo. Essas altas concentrações de imunoglobulinas séricas também interferem no resultado de velocidade da sedimentação eritrocitária (VHS) por formarem *rouleaux* eritrocitário devido à anulação do fator "zeta" das hemácias (carga elétrica entre as hemácias que evita o empilhamento).

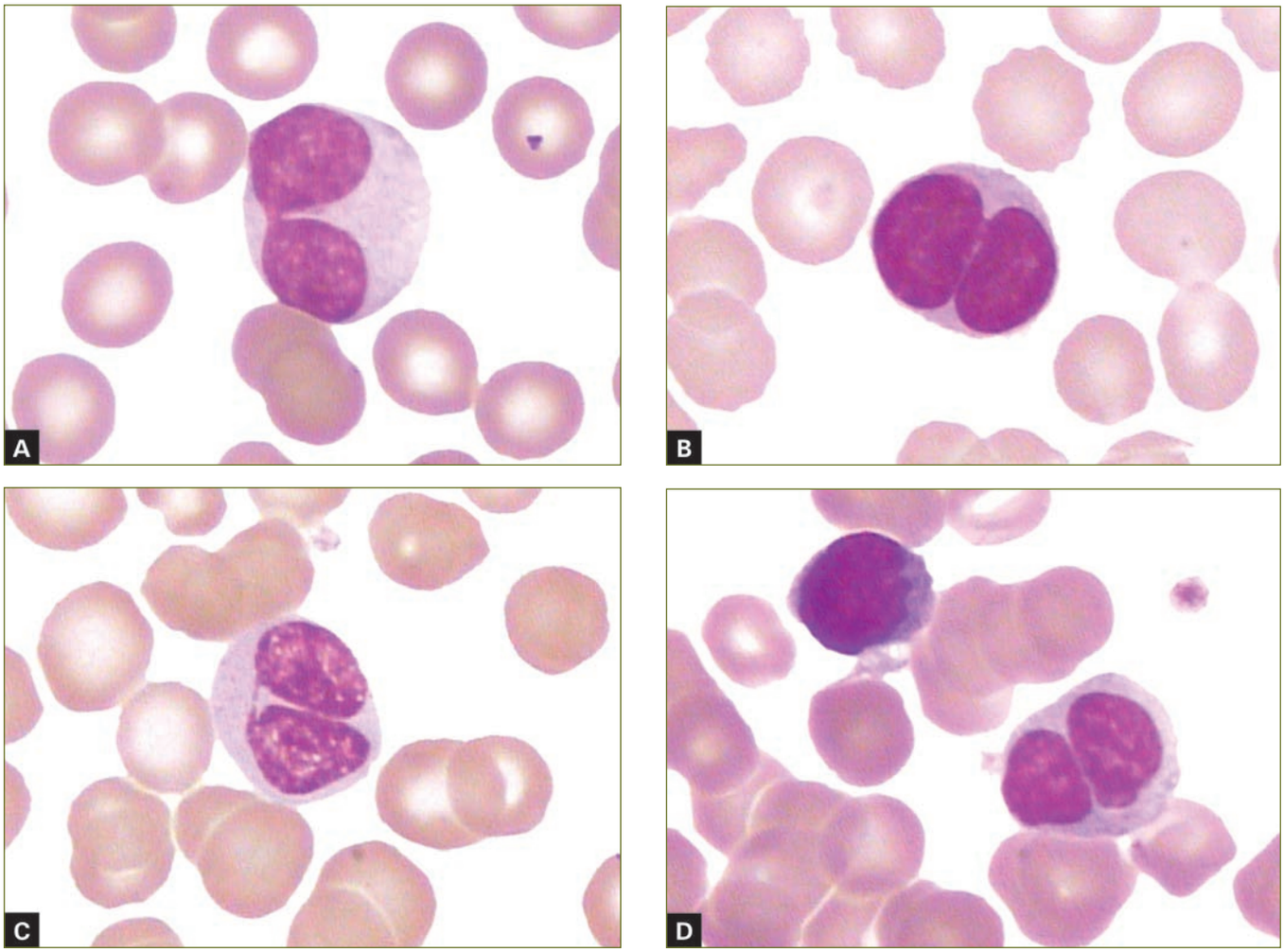


Figura 4.181 (**A** a **D**) PPBL: linfócitos bilobulados e binucleados (2.000×)

O mieloma múltiplo classifica-se de acordo com o tipo da imunoglobulina presente, conforme descrito a seguir:

- **IgG**: mais de 60% dos mielomas múltiplos são de imunoglobulinas G. Neste tipo, são mais frequentes as infecções e o crescimento tumoral, porém a calcemia é mais baixa. Este tipo está associado a uma maior redução da imunoglobulina normal, e há uma concentração sérica mais alta de proteína M.
- **IgA**: os mielomas múltiplos do tipo IgA apresentam-se em mais de 20% de todos os casos. O aumento da viscosidade do sangue é muito comum, devido à tendência dos componentes M IgA a formar polímeros. A hipercalcemia e as infecções complicadas são bastante vistas neste tipo. A amiloidose não é frequente neste tipo de mieloma.
- **IgD e IgE**: são bastante raros, com menos que 1% de todos os casos. Mais frequentes em homens, sua principal característica é a lesão extraóssea. Dois terços dos pacientes têm menos de 60 anos de idade no momento do diagnóstico. A proteinúria e a proteinemia de Bence Jones são evidentes. A sobrevida dos pacientes com este tipo de mieloma é curta: em média, 14 meses após o diagnóstico.

Nos exames de laboratório, observam-se anemia (normocrômica e normocítica) com hemoglobina entre 7 e 10g/dL e característico *rouleaux* eritrocitário. A contagem de reticulócitos está diminuída e a contagem global de leucócitos geralmente é normal, com a presença de células plasmáticas e linfócitos de aparência imatura (Figuras 4.182 a 4.185). Já a contagem de plaquetas é normal ou diminuída, e a eletroforese de proteínas apresenta um pico monoclonal. Em mais de 70% dos pacientes, a urina contém uma proteína de cadeia leve e livre, conhecida como proteína de Bence Jones. A dosagem de albumina e beta-2 microglobulina estão elevadas.

O aspirado de medula óssea é necessário para o diagnóstico do mieloma múltiplo, no qual se destaca a grande quantidade de células plasmáticas com aparência maligna e morfologia bizarra. Contudo, o diagnóstico depende de três achados principais: proteína monoclonal no soro e/ou na urina; o aumento de plasmócitos na medula óssea em mais de 10%; e danos a tecidos ou órgãos, como insuficiência renal e doença óssea. Na medula óssea, se a contagem de plasmócitos for maior que 10%, mas não houver lesões ou dano tecidual, a doença é denominada "mieloma assintomático".

Clinicamente, o mieloma múltiplo causa dor óssea (geralmente nas costas) por causa do colapso vertebral e de fraturas patológicas, fraqueza, perda de peso, letargia, dispneia, taquicardia, lesões esqueléticas e doenças renais. A síndrome de hiperviscosidade ocorre em 2% dos casos com púrpura, hemorragias, perda da visão, sintomas do sistema nervoso central (SNC), neuropatias e insuficiência cardíaca.

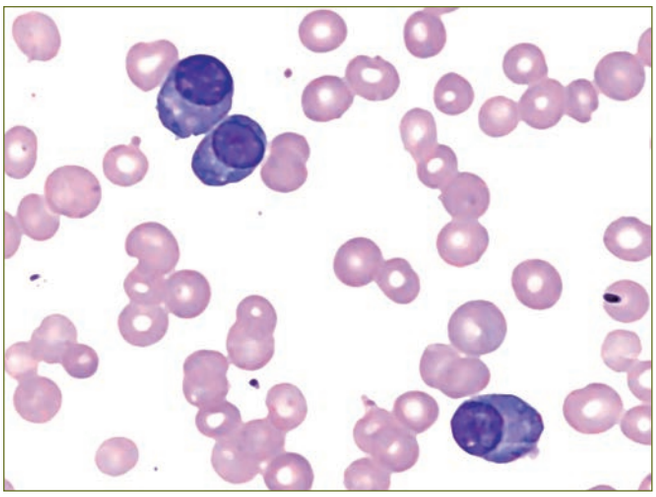


Figura 4.182 Mieloma múltiplo: plasmócitos e *rouleaux* eritrocitário (2.000×)

No entanto, a causa de morte mais frequente é por infecções recorrentes (surtos repetitivos de sepse) por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, relacionadas com produção insuficiente de anticorpos, imunidade celular alterada e neutropenia. A sobrevida média dos pacientes com mieloma múltiplo é de, aproximadamente, três anos.

O tratamento da doença pode ser dividido em específico e de suporte. Isso porque o mieloma múltiplo persiste incurável, não contemplando os raros pacientes mais jovens que podem ser curados com transplante alogênico de células-tronco. O tratamento específico pode ser intensivo, principalmente em pacientes abaixo de 70 anos, e não intensivo, para aqueles acima desta faixa etária.

No tratamento intensivo, utiliza-se uma combinação de vários cursos de quimioterapia para reduzir a massa tumoral. Somente então são coletadas células-tronco para transplante autólogo. Após quimioterapia em alta dose, podem ser usados ciclos repetitivos de quimioterapia oral ou intravenosa com ciclofosfamida, dexametasona, vincristina, adriamicina e

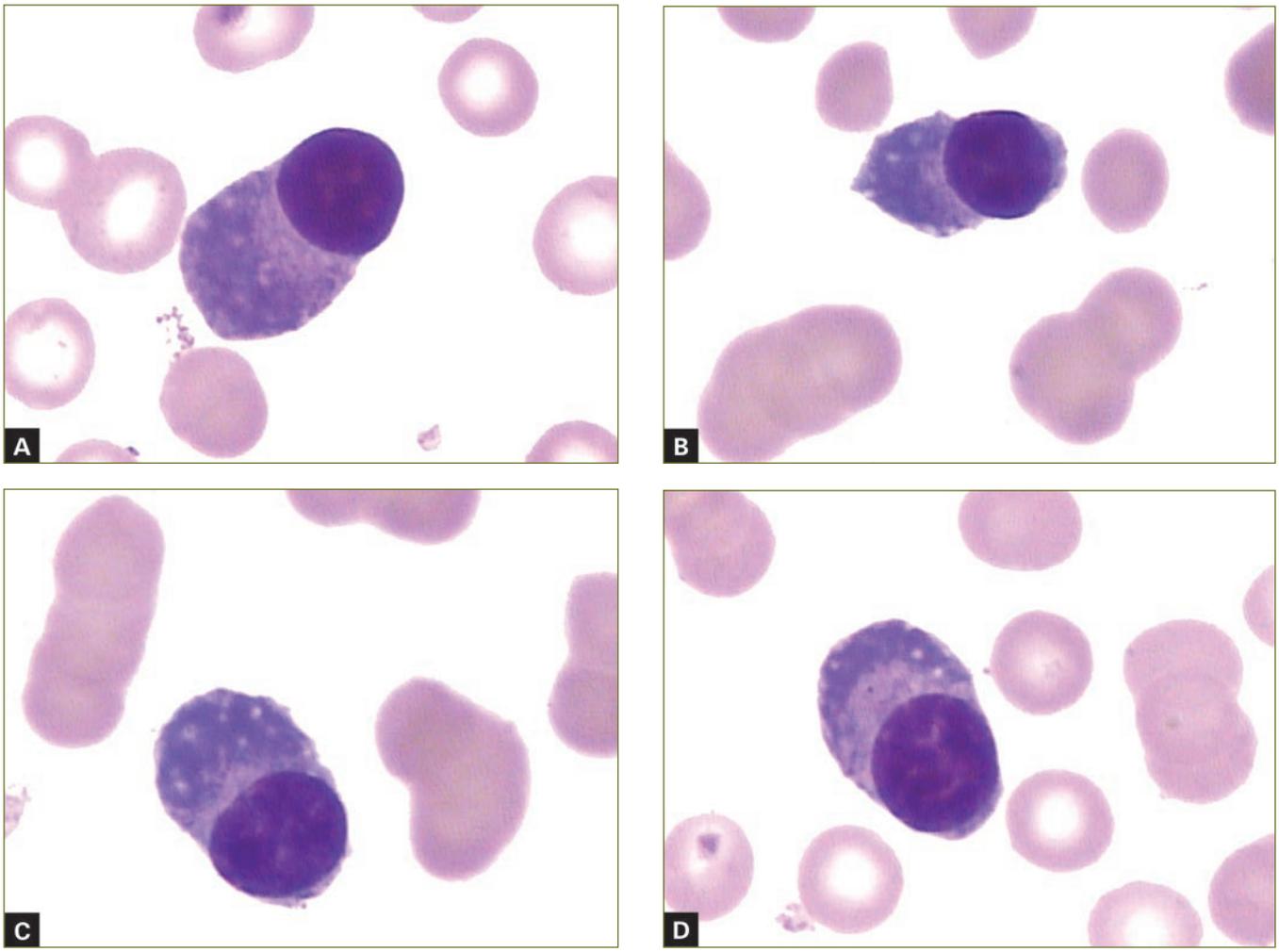


Figura 4.183 (**A** a **D**) Mieloma múltiplo: plasmócitos (2.000×)

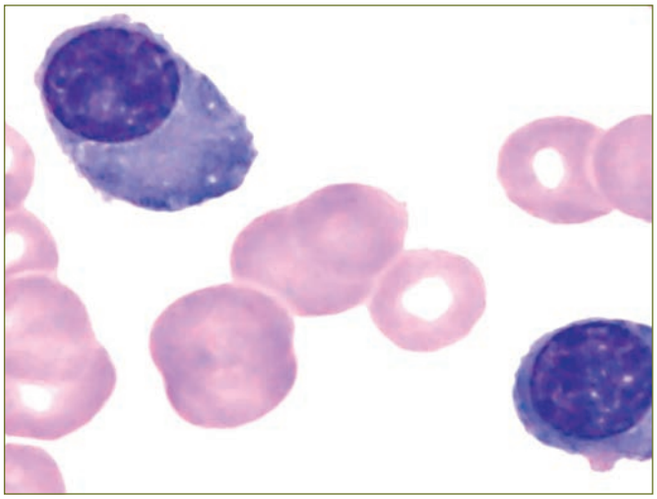


Figura 4.184 Mieloma múltiplo: plasmócitos (2.000×)

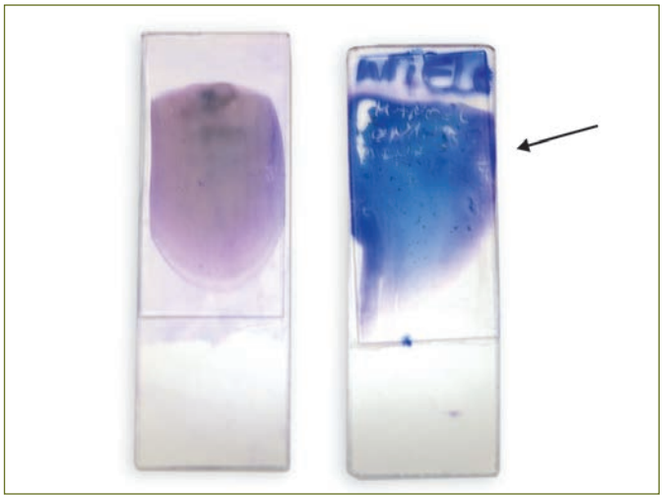


Figura 4.185 Mieloma múltiplo: lâmina com coloração azulada por causa do excesso de imunoglobulinas (*seta*)

talidomida. São coletadas células-tronco periféricas após mobilização com uma combinação de fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) e quimioterapia. Contudo, o transplante de células-tronco alogênico no mieloma múltiplo pode curar a doença, mas é um procedimento associado a alta mortalidade, com altos índices de recaída após tratamento.

O tratamento não intensivo é utilizado em pacientes idosos e consiste em agentes alquilantes com combinação, às vezes, com prednisolona em doses mensais. Estas são bastante eficazes na redução da massa tumoral. Entretanto, a talidomida, medicamento imunomodulador que evita a formação de novos vasos sanguíneos, é usada com progressiva diminuição da paraproteína, o que melhora as lesões ósseas e as contagens do hemograma.

A bortezomiba é um fármaco com efeito comprovado na doença refratária, experimentada na fase inicial do tratamento, inibindo o proteassomo celular. Também se utiliza a radioterapia no mieloma múltiplo, com alta eficácia no tratamento de sintomas locais da doença, sendo usada em regiões de dor óssea ou de compressão da medula espinal.

O tratamento de suporte é feito de acordo com o surgimento da lesão da doença, como a lesão óssea e a calcemia. Bifosfofatos, como o pamidronato, o clodronato ou o ácido zeledrônico, são eficazes na diminuição da progressão das lesões ósseas, podendo melhorar a sobrevida global do paciente.

Os plasmócitos normais podem ser diferenciados daqueles existentes no mieloma múltiplo por imunofenotipagem, ao apresentarem os marcadores CD45+, CD19+, CD20+, CD38++, CD138+ e CD56-(fraco). O imunofenótipo característico do plasmócito maligno é o CD19– e o CD56+ em 80% dos casos. Nos 20% restantes, os plasmócitos apresentam CD19– e CD56–. A interleucina 6 é um potente fator de crescimento para células plasmáticas, e está frequentemente ativa no mieloma múltiplo.

Na gamopatia monoclonal de causa indeterminada, existe uma mistura de plasmócitos normais e neoplásicos, que apresenta um perfil semelhante ao do mieloma múltiplo.

A doença residual na medula óssea é importante para estimar a resposta terapêutica e pode ser avaliada por citometria de fluxo e pela reação em cadeia de polimerase (PCR), para o rearranjo da cadeia pesada da imunoglobulina.

Algumas formas variantes de mieloma múltiplo são encontradas raramente, como:

- Mieloma múltiplo de evolução lenta.
- Mieloma osteoesclerótico.
- Mieloma não secretor.
- Mieloma secretor de cadeias leves.

Mieloma múltiplo de evolução lenta

Para o diagnóstico deste tipo de mieloma são necessários, pelo menos, 10% de plasmócitos na medula óssea, uma proteína com pico monoclonal inferior a 3g/dL no soro e clinicamente sem lesões esqueléticas, insuficiência renal e anemia. A grande importância do diagnóstico correto para esta variante de mieloma múltiplo,é que os pacientes portadores de mieloma múltiplo de evolução lenta não devem ser tratados até que ocorra alguma progressão da doença.

Mieloma osteoesclerótico

Os pacientes com mieloma osteoesclerótico apresentam polineuropatia crônica desmielinizante, a qual leva à deficiência motora grave. As lesões osteoescleróticas da doença são caracteristicamente únicas ou múltiplas.

Os plasmócitos podem produzir substâncias tóxicas aos nervos periféricos e promover anormalidades endócrinas. A síndrome POEMS (presença concomitante de doença monoclonal de plasmócitos, polineuropatia periférica e outras manifestações paraneoplásicas) é rara e atua sobre os sistemas imune, endócrino, vascular e nervoso. Ao contrário do mieloma múltiplo, a POEMS apresenta hemoglobina normal, contagem de plaquetas elevada e menos de 5% de plasmócitos na medula óssea, porém são menos frequentes a insuficiência renal, a hepatoesplenomegalia e a hipercalcemia.

Quando localizadas, as lesões escleróticas podem ser tratadas com radioterapia, o que melhora a neuropatia. A prednisona e o melfalano também são utilizados no tratamento do mieloma osteoesclerótico. O diagnóstico é feito na biópsia da lesão esclerótica com plasmócitos.

Mieloma não secretor

No mieloma não secretor, o quadro clínico, a evolução da doença e a sobrevida são semelhantes aos pacientes com mieloma múltiplo clássico, devendo ser tratado da mesma maneira. O diagnóstico do mieloma não secretor deve ser feito pelo achado de infiltrado anormal de plasmócitos e plasmoblastos na medula óssea ou em uma biópsia de uma lesão lítica.

Neste tipo de mieloma, a frequência é cerca de 1% de todos os casos e não se detecta pico monoclonal no soro ou presença de proteína de Bence Jones na urina. Acredita-se que os plasmócitos do mieloma não secretor não sintetizam moléculas completas de imunoglobulinas, ou de cadeias leves em quantidades insuficientes.

Mieloma secretor de cadeias leves

O mieloma secretor de cadeias leves tem evolução distinta. Por vezes, a doença óssea é mais evidente que nos demais tipos de mieloma.

Este tipo de mieloma também é conhecido como doença de Bence Jones. É uma situação clínica em que apenas uma parte das imunoglobulinas está aumentada.

Na urina e no soro são encontradas cadeias leves do tipo kappa ou lambda. Neste mieloma, apenas um tipo de cadeia leve está aumentado.

Relata-se que o mieloma secretor de cadeias leves é o que cresce mais rápido entre todos os mielomas. Associado a mais lesões osteolíticas, tem maior hipercalcemia e uma incidência mais alta de insuficiência renal. Os pacientes com este tipo de mieloma apresentam um mau prognóstico, especialmente aqueles com a doença de cadeia leve (lambda) com sobrevida média de 10 meses. Enquanto isso, os pacientes com a doença de cadeia leve (kappa) apresentam uma sobrevida média de 30 meses.

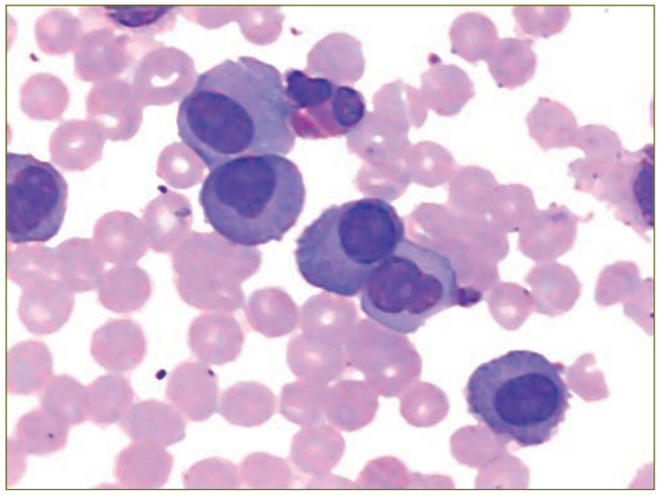


Figura 4.186 Leucemia de células plasmáticas: plasmócitos (800×)

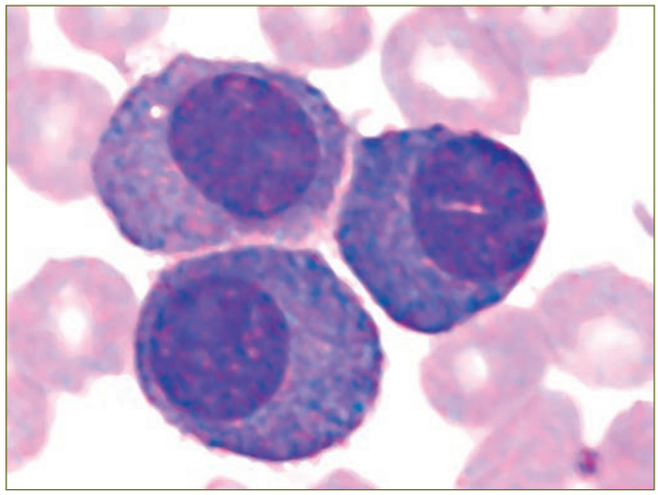


Figura 4.187 Leucemia de células plasmáticas: plasmócitos (2.000×)

LEUCEMIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS

Esta doença caracteriza-se pela presença de mais de 2.000 plasmócitos e plasmoblastos por mm^3 no sangue periférico. Tais células podem frequentemente apresentar-se pequenas, com citoplasma relativamente pequenos, e semelhantes aos linfócitos plasmocitoides (Figuras 4.186 e 4.187).

Considera-se a leucemia de células plasmáticas como primária quando o diagnóstico é feito na forma leucêmica da doença (60% dos casos) e secundária se ela for decorrente de um mieloma múltiplo (40% dos casos).

Nesta leucemia, os níveis de proteínas monoclonais são baixos, não há formação de *rouleaux* eritrocitário. Há hepatomegalia e linfadenomegalia, porém não ocorrem lesões osteolíticas. É comum a infiltração de tecidos.

A leucemia de células plasmáticas primária ocorre com maior frequência em jovens. Os plasmócitos nessa variante de mieloma são encontrados extramedulares, em locais como fígado, baço, líquido pleural e ascítico.

Indica-se o transplante de medula óssea com células precursoras hematopoéticas no tratamento da leucemia de células plasmáticas. Ao contrário da maioria dos mielomas, mais de 80% dos pacientes com leucemia de células plasmáticas são CD56 negativos.

MACROGLOBULINEMIA DE WALDENSTRÖM

A macroglobulinemia de Waldenström foi descrita pela primeira vez por Jan Gösta Waldenström, em 1944, que identificou dois pacientes que apresentavam linfoadenopatia, anemia, trombocitopenia e sangramento oronasal. As macroglobulinas, que são as imunoglobulinas M (IgM), têm um alto peso molecular e correspondem aproximadamente a 5% de todas as proteínas séricas.

A macroglobulinemia de Waldenström é semelhante ao linfoma linfoplasmocítico e tem como característica a produção exagerada de IgM, o que é causado pelo crescimento desordenado de pequenos linfócitos B, os quais maturam para plasmócitos. A doença é mais comum em pacientes com idade média de 60 anos.

As manifestações clínicas mais frequentes são perda de peso, hepatoesplenomegalia, púrpuras, manifestações hemorrágicas, fraqueza e anorexia. No sangue periférico, o mais comum é o evidente *rouleaux* eritrocitário e um pico monclonal de IgM, além do aumento da viscosidade do sangue.

São bastante comuns linfócitos plasmocitoides, linfócitos e plasmócitos infiltrados na medula óssea e no sangue periférico. No diagnóstico da macroglobulinemia de Waldenström, é importante a diferenciação com outras doenças linfoproliferativas B secretoras de componente monoclonal IgM. A macroglobulinemia de Waldenström é uma entidade clínicopatológica caracterizada como uma doença primária da medula óssea. Realiza-se o diagnóstico na presença de infiltrado de medula óssea monoclonal, por pequenos linfócitos B com diferenciação plasmocitoide.

Muitas vezes, a medula óssea não pode ser aspirada com facilidade. As células linfoides presentes em grande quantidade têm semelhança com pequenos linfócitos normais. Entretanto, ocasionalmente há células plasmocitoides e plasmócitos em número aumentado. No citoplasma e no núcleo das células linfoides, várias vezes são observadas as inclusões PAS positivas. Os mastócitos tissulares também podem estar em número aumentado.

Há crioglobulinemia mais frequentemente do que no mieloma múltiplo e ela pode ser responsável pela sensibilidade ao frio e pelo fenômeno de Raynaud. A viscosidade relativa do soro está evidentemente elevada nos pacientes com macroglobulinemia de Waldenström. Na maioria dos casos, os sintomas da hiperviscosidade surgem em pacientes com viscosidade relativa do soro aumentada.

A macroglobulinemia de Waldenström morfologicamente apresenta células plasmocitoides, mas poucas células CD138 são detectadas na medula óssea ou no sangue periférico dos pacientes (Figuras 1.88 a 1.191). A expressão de CD20 ocorre em praticamente todos os casos. Os plasmócitos na macroglobulinemia de Waldenström, quando presentes, expressam

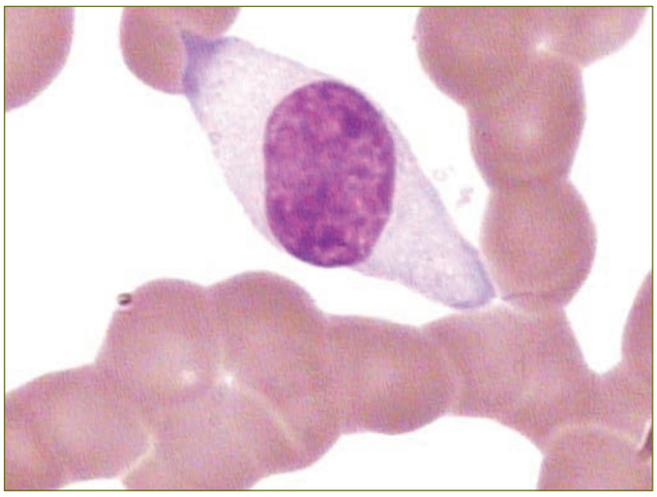


Figura 4.188 Macroglobulinemia de Waldenström: linfócito plasmocitoide – *rouleaux* eritrocitário (2.000×)

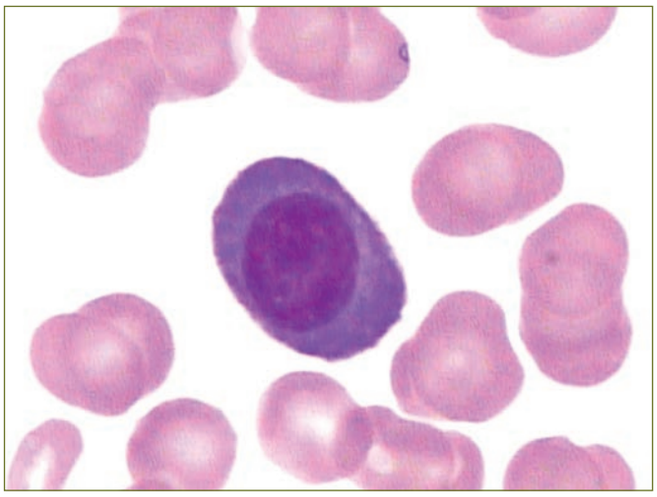


Figura 4.190 Macroglobulinemia de Waldenström: linfócito plasmocitoide apresentando núcleo central – *rouleaux* eritrocitário (2.000×)

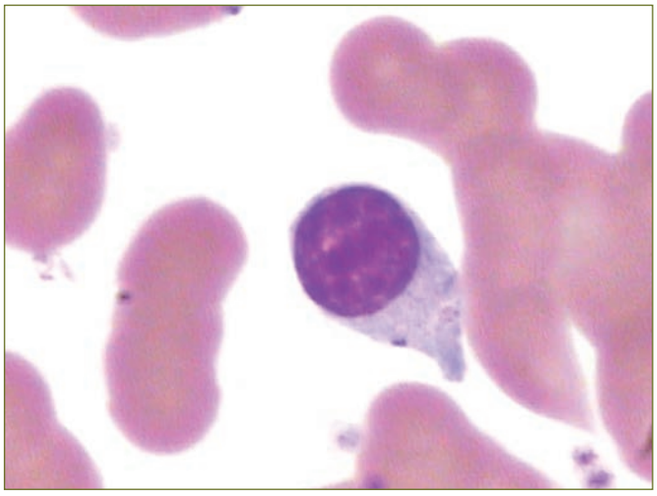


Figura 4.189 Macroglobulinemia de Waldenström: linfócito plasmocitoide – *rouleaux* eritrocitário (2.000×)

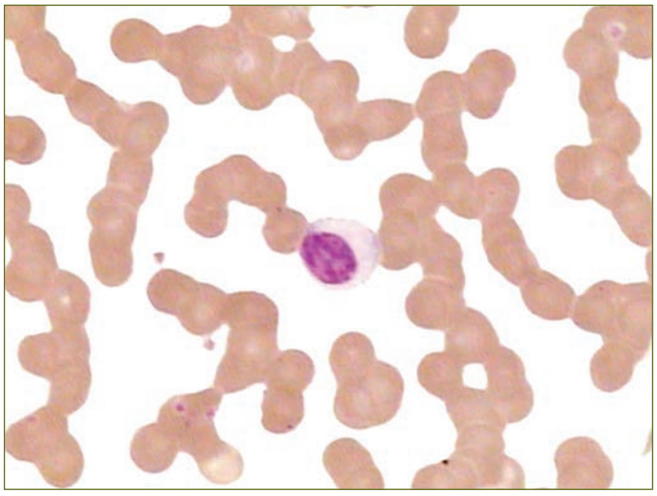


Figura 4.191 Macroglobulinemia de Waldenström: linfócito plasmocitoide – *rouleaux* eritrocitário (800×)

o CD20 e não expressam o CD138, diferenciando-se dos plasmócitos do mieloma múltiplo (CD20– e CD138+). A maioria das células expressa a IgM.

PLASMACITOMA

O plasmacitoma classifica-se em dois tipos: solitário do osso e extramedular. A forma "solitário do osso" corresponde a 5% das neoplasias do plasmócito. No estudo radiológico completo do esqueleto, não são observadas lesões líticas, não há pico monoclonal no soro e não se detecta proteína de Bence Jones na urina. Na punção e na biópsia de medula óssea, não se observam anormalidades quantitativas ou qualitativas dos plasmócitos.

Os locais mais acometidos do plasmacitoma solitário do osso são crânio, vértebras, costela, pelve, fêmur, escápula e clavícula. O estudo histológico de um tumor de plasmócitos solitários, idêntico aos encontrados no mieloma múltiplo, é a base para o diagnóstico do plasmacitoma solitário de osso. Em estudos mais recentes, foi observado que aproximadamente 70% dos pacientes com plasmacitoma desenvolvem mieloma múltiplo.

A quimioterapia não evita a progressão da doença para mieloma múltiplo nem proporciona bons resultados em pacientes com plasmacitoma solitário de osso. Todavia, a radioterapia é o tratamento de escolha para esta doença. Vale acompanhar este tratamento com o estudo de proteínas do soro, urina e estudo radiológico dos ossos.

A forma extramedular do plasmacitoma corresponde a 3% a 5% de todas as neoplasias do plasmócito. Mais de 80% dos tumores neste tipo de plasmacitoma surgem geralmente no trato respiratório superior (fossas nasais, nasofaringe etc.). Além disso, podem aparecer, ainda, no trato digestivo, no sistema nervoso central, na glândula parótida, nos linfonodos, na bexiga, na tireoide, nas mamas e nos testículos. Este plasmacitoma apresenta um prognóstico favorável. Apenas 20% de pacientes com plasmacitoma extramedular apresentam progressão da doença, e apenas de 10% a 20% evoluem para mieloma múltiplo.

O diagnóstico desse tipo de plasmacitoma é feito primeiramente pela biópsia de um tumor extramedular, no qual se evidenciam plasmócitos. É necessário demonstrar a ausência de alterações plasmocíticas na medula óssea, além de alterações de proteína do soro, urina e lesões ósseas no exame radiológico. O tratamento do plasmacitoma extramedular é localizado, com radioterapia e eventual cirurgia para remoção do tumor extramedular.

DOENÇAS DE CADEIAS PESADAS

Estas doenças caracterizam-se pela produção exagerada de imunoglobulinas monoclonais anormais, constituídas apenas por cadeias pesadas. São doenças derivadas de processos linfoproliferativos dos linfócitos B, e seu diagnóstico ao se identificar imunoglobulinas com estruturas anormais na urina e no soro.

São classificadas em três tipos, de acordo com a cadeia pesada:

- **Doença de cadeia pesada do tipo gama**: esta doença é mais comum em pacientes com mais 60 anos de idade e tem evolução bastante variável, partindo desde o quadro assintomático até o rapidamente progressivo. Os sintomas clínicos encontrados são febre, fraqueza, fadiga, anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia, manifestações neurológicas e aumento de língua e parótidas. Além de hepatoesplenomegalia e linfonodomegalia, o aumento no número de plasmócitos, linfócitos plasmocitoides, linfócitos na medula óssea e linfonodos é frequente nesta doença. No aspirado de medula óssea, observa-se um aumento do número de linfócitos, células linfoplasmocitoides e plasmócitos. A imunofenotipagem desta doença apresenta cadeia pesada gama nos plasmócitos e nas células linfoplasmocitárias. Tais células não expressam o CD5 e o CD10.
- **Doença de cadeia pesada do tipo alfa**: os pacientes acometidos por esta doença estão na faixa etária entre 15 e 35 anos e geralmente têm baixo poder econômico, pouca higiene e histórias de infecções intestinais frequentes. A doença de cadeia pesada do tipo alfa caracteriza-se pela extensa infiltração e ulceração ao longo do intestino delgado.

  As infiltrações plasmocíticas no intestino delgado provocam manifestações clínicas como vômito, diarreia, síndrome da má absorção, fístulas, obstrução e perfuração do intestino. No fenótipo tumoral, os plasmócitos e células da zona marginal expressam antígenos pan-B, e a cadeia pesada alfa. Não há expressão de cadeia leve, CD5 e CD10.
- **Doença de cadeia pesada do tipo mu**: é uma doença extremamente rara e mais frequente em pacientes com idade média de 60 anos. A proteína anormal é a cadeia do tipo 1. Apenas 30 casos da doença foram descritos até agora. A hepatoesplenomegalia e a linfonodomegalia são as manifestações clínicas mais comuns. Já as lesões ósseas são raras nesta doença. A doença da cadeia pesada do tipo mu geralmente está associada a doenças linfoproliferativas, como a leucemia linfoide crônica. O fenótipo tumoral desta doença apresenta expressão citoplasmática monoclonal de cadeia pesada mu e ausência de expressão de cadeia leve, CD5 e CD10.

AMILOIDOSE

A amiloidose não é uma doença única, e sim um termo que identifica doenças com depósitos de material proteináceo. Assim, abrange um grande número de doenças. Pelo menos 21 proteínas diferentes são reconhecidas como causa de amiloidose. É uma doença bastante incomum, afeta 8 a cada 1 milhão de pessoas, e a idade de maior frequência ao diagnóstico é de 62 anos.

A deposição extracelular em órgãos e tecidos de uma proteína fibrilar patológica e insolúvel é a principal característica da doença. A amiloidose tem como precursora uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina que está associada a um distúrbio de plasmócitos.

A deposição de proteínas é mais frequente em glândulas salivares, gengiva, reto, medula óssea, gordura subcutânea e estômago. A biópsia é feita para identificar a amiloidose nessas regiões. Os achados clínicos mais comuns da amiloidose são edema submandibular, aumento da língua, púrpura facial e hipertrofia muscular.

A amiloidose primária é uma forma de neoplasia de plasmócitos que secreta uma imunoglobulina anormal, formando depósito de amiloide. A cadeia leve lambda é o subtipo mais frequente neste tipo de amiloidose.

O tratamento tem como objetivo a destruição da população de células monoclonais produtoras de amiloide. Os pacientes que respondem ao tratamento apresentam sobrevida média de 90 meses. Os depósitos de amiloide levam em média, geralmente, 12 meses para mobilização, e muitos pacientes não conseguem ter a chance de resposta ao tratamento. As medicações frequentemente utilizadas no tratamento da amiloidose são melfalano e a prednisona. Também se utiliza a quimioterapia de altas doses no tratamento de alguns pacientes.

LINFOMAS

Os linfomas são classificados em Hodgkin e não Hodgkin. Para se entender melhor os linfomas, é necessária uma breve revisão sobre os linfonodos e órgãos linfoides.

Os linfonodos são divididos em duas partes: centro germinativo e tecido linforeticular. Existem três tipos principais de células no linfonodo e em outros tecidos linfoides: linfoblasto, linfócito e células reticulares. As neoplasias malignas ocorrem a partir de qualquer uma dessas linhagens.

LINFOMA DE HODGKIN (DOENÇA DE HODGKIN)

O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia maligna associada à linfadenomegalia, com localização mais frequente na região acima do diafragma, principalmente nos linfonodos cervicais altos e supraclaviculares. Pode ocorrer em qualquer idade, mas sua incidência é maior em adultos jovens do sexo masculino. Devido à sua boa resposta à terapia, a cura pode chegar a mais de 80% dos casos.

A presença de célula de Reed-Sternberg, linhagem celular maligna em infiltrados inflamatórios reacionais, é patognomônica do linfoma de Hodgkin e sugere sua origem da célula linfoide imatura de linhagem B transformada anteriormente. A célula de Reed-Sternberg não é encontrada no sangue periférico.

Morfologia das células de Reed-Sternberg

As células de Reed-Sternberg são células grandes de núcleos polilobulados ou multinucleados. Cada núcleo apresenta um nucléolo grande medindo cerca de 10mm e tem afinidade eosinofílica.

Observa-se, também, uma zona mais clara da cromatina ao redor do nucléolo. São vistas frequentemente figuras de mitose e apoptose celular. As células de Reed-Sternberg são conhecidas tradicionalmente por "olho de coruja".

Laboratório

Características laboratoriais nas contagens celulares e dosagem bioquímica nos pacientes com linfoma de Hodgkin:

- Contagem de reticulócitos é normal ou diminuída.
- Leucometria é normal ou aumentada.
- A eosinofilia é rara; porém, quando presente, é de nível alto.
- Monócitos, neutrófilos e basófilos podem estar em níveis discretamente aumentados.
- Plasmócitos e linfócitos com nucléolos e de aspecto anormal podem ser encontrados.
- Geralmente, a contagem de plaquetas é normal, mas quando diminuída sugere o envolvimento da medula óssea, fato raro no linfoma de Hodgkin. Morfologicamente, as plaquetas costumam ser bizarras e grandes.
- É comum a ferropenia.
- VHS aumentado indica estágio mais avançado da doença.

Clínica

A manifestação mais comum é um ou mais linfonodos cervicais aumentados e indolores, sem sintomas sistêmicos. Febre sem sintomas de infecção, perda de peso e sudorese noturna indicam prognóstico grave.

Fato comum, mas inexplicado, é o surgimento de dores no local da infiltração do linfoma de Hodgkin (geralmente no mediastino) logo após a ingestão de bebida alcoólica. Pode ocorrer esplenomegalia.

Locais de surgimento do linfoma de Hodgkin

- Linfonodos cervicais altos.
- Linfonodos supraclaviculares.
- Linfonodos abdominais.
- Linfonodos axilares.
- Estrutura mediastínica.
- Baço.

Estadiamento clínico

- **Estádio I**: envolvimento de uma única região de linfonodos ou estrutura linfoide. Exemplo: baço, timo etc.
- **Estádio II**: envolvimento de duas ou mais regiões de linfonodos.
- **Estádio III**: envolvimento de regiões de linfonodos ou estruturas em ambos os lados do diafragma.
- **Estádio IV**: envolvimento do sítio extranodal.

LINFOMA NÃO HODGKIN

Na década passada, o desenvolvimento da biologia molecular proporcionou ao diagnóstico histológico dos linfomas novos conhecimentos sobre suas diversidades genéticas e moleculares. Hoje, são reconhecidos mais de 30 tipos de linfomas não Hodgkin.

Agentes ambientais e anormalidades genéticas herdadas podem participar na produção de alterações cromossômicas irreversíveis, predispondo ao linfoma não Hodgkin. O linfoma não Hodgkin é a quinta causa de morte por câncer nas últimas pesquisas e ocupa também a quinta posição em frequência de neoplasias.

Desde 1980, aumentam o número de casos de linfoma não Hodgkin, o que também se deve à associação ao vírus do HIV. Esses linfomas são de alto grau de malignidade e acometem o SNC em 60% dos pacientes com AIDS.

Além disso, o linfoma não Hodgkin tem alta incidência entre os pacientes que utilizam fármacos imunossupressores,

pós-transplante de órgãos e em várias situações de imunodeficiência com forte associação ao EBV. A exposição a pesticidas e herbicidas também é fator de risco para o linfoma não Hodgkin. Neste linfoma, é comum a situação extranodal.

Desde 1970, os linfomas não Hodgkin passaram por seis classificações baseadas em critérios morfológicos, imunológicos, genéticos e clínicos. As três classificações mais usadas são a Working Formulation (WF), a Revised European-American Lymphoma Classification (REAL) e a da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Linfomas não Hodgkin de células B

Linfoma linfoblástico B (leucemia linfoblástica aguda)

Cerca de 5% a 10% dos linfomas de células B são do tipo linfoblástico B. Neste tipo de linfoma, os sítios envolvidos costumam ser linfonodos, pele e osso.

Na leucemia, a medula óssea e o sangue periférico são também envolvidos. As células blásticas são pouco maiores que os pequenos linfócitos e têm núcleo ovalado ou convoluto, nucléolos pequenos e cromatina delicada, o que os diferencia do linfoma de células do manto na forma blastoide.

Em geral, o linfoma linfoblástico B progride para a forma leucêmica na maioria dos casos, especialmente quando não há resposta ao tratamento. O diagnóstico diferencial do linfoma linfoblástico B é feito com o linfoma de células do manto na forma blastoide. Na imunofenotipagem, a característica maior é a expressão de transferase do desoxinucleotídio terminal (TdT). Entretanto, este linfoma também expressa o CD19, o CD22 e o CD79a, antígenos de células B. Contudo, o linfoma linfoblástico B pode ser CD20 negativo.

As células do linfoma linfoblástico B apresentam um rearranjo de genes de cadeia pesada de imunoglobulina como achado genético característico. No aspecto histológico, este linfoma apresenta neoplasias com monotonia celular e um grande número de mitoses (Figuras 4.192 e 4.193).

As condições clínicas e morfológicas do linfoma linfoblástico B misturam-se com a leucemia linfoblástica aguda. São tratadas da mesma maneira. A célula normal correspondente é o precursor da célula B na medula óssea.

Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt é uma neoplasia de crescimento rápido, que corresponde a 35% dos linfomas de crianças. Em geral, apresenta-se com massa íleo-cecal, porém os rins, os ovários e as mamas são frequentemente acometidos. Ocorre de forma endêmica e esporádica.

A forma endêmica é vista em regiões africanas, geralmente em áreas com exposição crônica à malária, e também em associação a infecções por EBV. Os pacientes com linfoma de Burkitt na forma endêmica quase sempre são crianças e geralmente apresentam linfonodopatia maciça da mandíbula.

O linfoma de Burkitt esporádico é também conhecido como "não africano". Tal forma pode ocorrer em qualquer região do mundo e não se associa à infecção por EBV. Em alguns pacientes, há comprometimento também da medula óssea e do sangue periférico, mas isso não indica um mau prognóstico. Comumente, o linfoma de Burkitt é associado também ao HIV, podendo às vezes ser o primeiro sinal da doença.

Morfologicamente, as células linfoides têm tamanho médio, núcleos redondos com pequenos nucléolos e citoplasma basofílico, além de, por vezes, apresentar vacuolização (linfoblasto-L3) (Figuras 4.194 e 4.195).

O tratamento com quimioterapia envolve altas doses de metotrexato e ciclofosfamina. É o esquema com melhores respostas e mais utilizado na terapia do linfoma de Burkitt.

O imunofenótipo deste linfoma é de células B, com os CD19, CD20, CD22, CD79a e CD10. Os marcadores tumorais CD5 e C23 são negativos e a IgM de superfície com restrição clonal de cadeias leves também é expressa. A expressão do antígeno Ki-67, relacionada com o ciclo celular, é praticamente detectada em todos pacientes com linfoma de Burkitt.

O genótipo tumoral característico da doença é, na maioria dos casos, a translocação do oncogene c-MYC, presente no

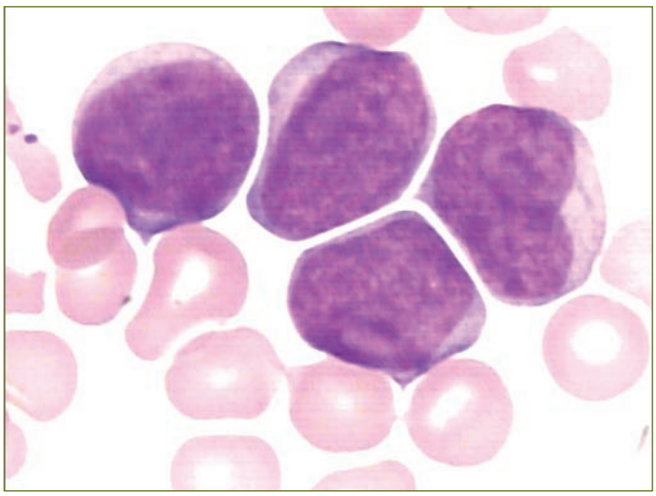


Figura 4.192 Linfoma linfoblástico/leucemia linfoblástica de células B precursoras: linfoblastos (2.000×)

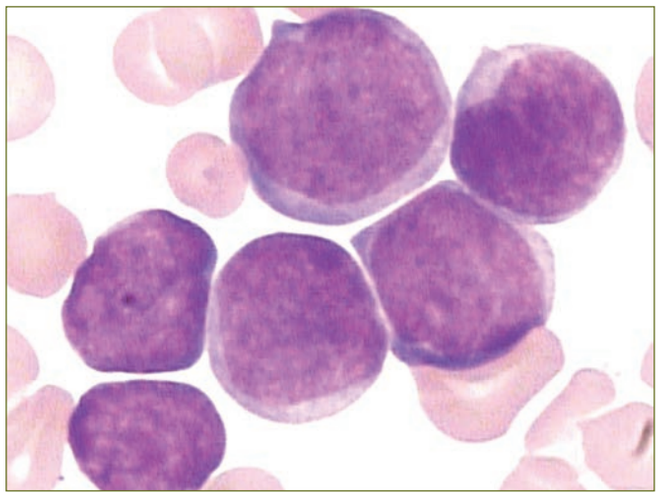


Figura 4.193 Linfoma linfoblástico/leucemia linfoblástica de células B precursoras: linfoblastos (2.000×)

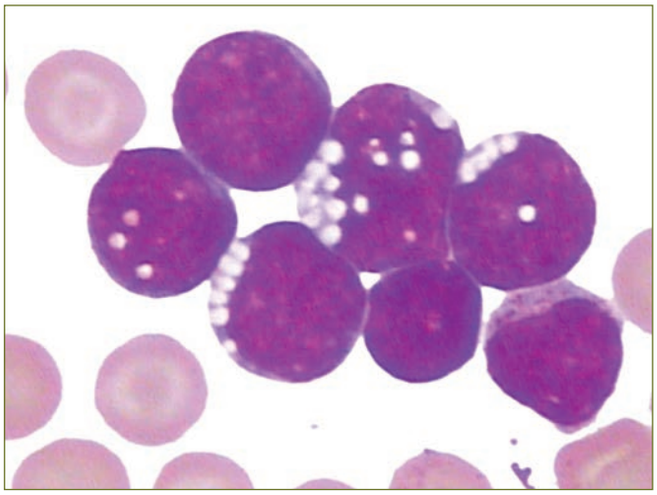


Figura 4.194 Linfoma de Burkitt: blastos linfoides do tipo L3 apresentando vacuolização e aumento da basofilia citoplasmática. Núcleo apresentando cromatina frouxa ou com padrão variável e esboço de nucléolo (2.000×)

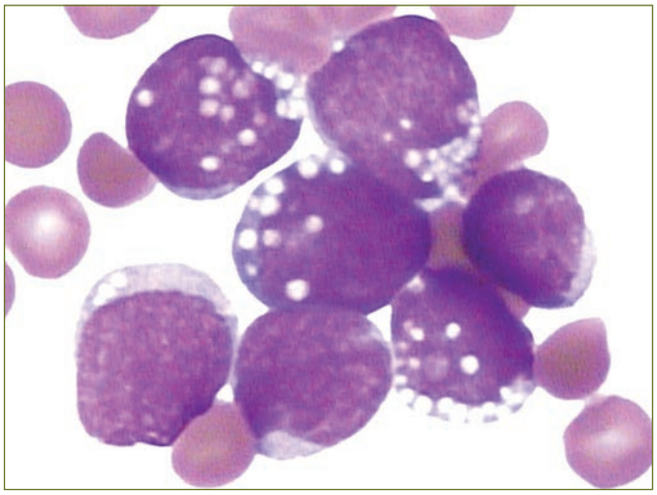


Figura 4.195 Linfoma de Burkitt: blastos linfoides do tipo L3 apresentando vacuolização e aumento da basofilia citoplasmática. Núcleo apresentando cromatina frouxa ou com padrão variável e esboço de nucléolo (2.000×)

cromossomo 8, para o lócus de cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, que resulta em t(8;14), t(2;8) ou t(8;22). A célula normal correspondente é a célula B, de repouso após passagem pelo centro germinativo.

Linfoma linfoplasmocítico (imunocitoma)

É um linfoma muito raro, com uma incidência de 1,5% de todos os linfomas nodais. Vários nomes são atribuídos a esse linfoma, como: linfoma linfocítico plasmocitoide bem diferenciado, linfoma plasmocítico-linfocítico e imunocitoma, tipo linfoplasmocítico.

Geralmente, este linfoma ocorre em pacientes adultos. Corresponde à macroglobulinemia de Waldenström, que é uma discrasia de células plasmáticas. A doença é predominante em idosos do sexo masculino, com a idade média de 63 anos, com anormalidades imunológicas e frequente alta produção de IgM monoclonal.

A linfocitose periférica é bem menor que na LLC-B. Os linfócitos apresentam aspectos morfológicos de diferenciação plasmocítica, com citoplasma geralmente grande (Figuras 4.196 e 4.197), porém as células mais parecidas com plasmócitos localizam-se nas áreas perivasculares. Contudo, podem ser observados também no sangue periférico linfócitos pequenos, linfócitos linfoplasmocíticos e alguns plasmócitos.

A linfadenomegalia generalizada, a esplenomegalia, a anemia hemolítica e a síndrome de hiperviscosidade são alterações que ocorrem no linfoma linfoplasmocítico. A síndrome da hiperviscosidade ocorre nesse linfoma devido à alta concentração de IgM, que é uma imunoglobulina de tamanho grande, causando alterações como distúrbios visuais, problemas neurológicos, hemorragias, fenômeno de Raynaud e urticária ao frio, causados pela crioglobulinemia.

O tratamento do linfoma linfoplasmocítico é feito com clorambucila oral, fludarabina ou anticorpos monoclonais, como

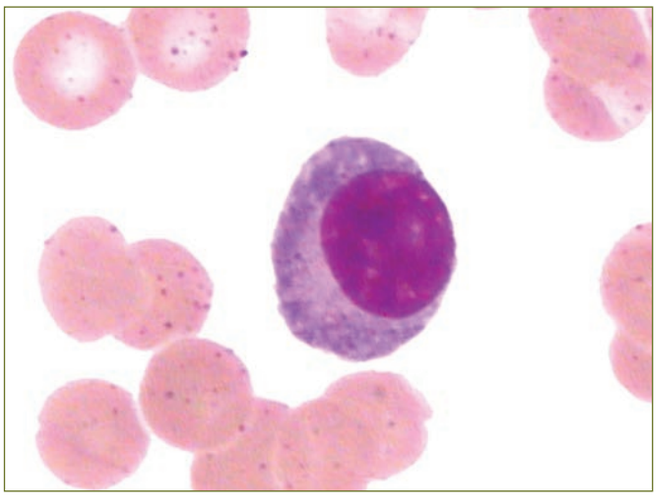


Figura 4.196 Linfoma linfoplasmocítico: linfócito plasmocitoide (2.000×)

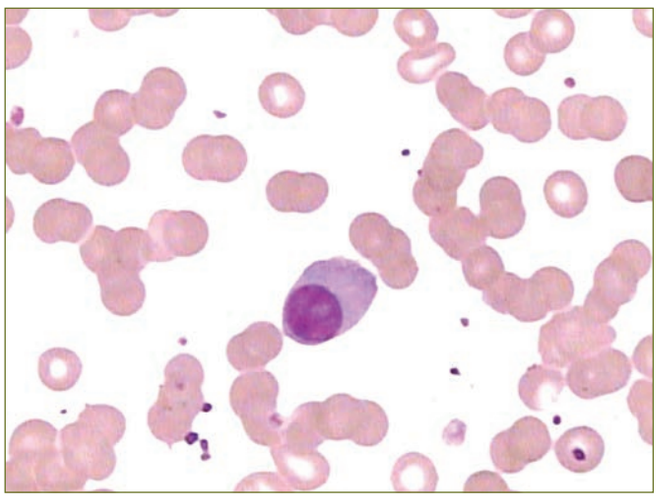


Figura 4.197 Linfoma linfoplasmocítico: plasmócito e *rouleaux* eritrocitário (800×)

o rituximab. Indica-se a troca de plasma para reduzir a hiperviscosidade.

Em alguns casos, observam-se nesse linfoma inclusões intranucleares ou citoplasmáticas de imunoglobulina, denominadas corpúsculo de Dutcher e Russell, encontradas geralmente na medula óssea. O imunofenótipo do linfoma linfoplasmacítico é de célula B, expressando os marcadores CD19, CD20, CD22 e CD79a. Esse linfoma não expressa os marcadores CD5 e CD10, demonstrando que as células B estão em estádio tardio de diferenciação. A célula normal correspondente é a célula B pós-folicular.

Linfoma de células do manto

É uma neoplasia linfoide incurável, com alto grau de malignidade e sobrevida estimada entre três e cinco anos. O linfoma de células do manto (LCM) deriva de células centrais pré-germinativas, ainda não estimuladas, localizadas nos folículos primários ou na região do manto de folículos secundários.

O LCM tem maior incidência em idosos do sexo masculino, e os sítios comprometidos mais comuns são linfonodos, baço, medula óssea e anel de Waldeyer. Também é comum o envolvimento do trato gastrintestinal na forma de polipose linfomatoide.

O LCM apresenta-se um pouco maior que um linfócito normal, com células pequenas, cromatina com finos agregados e citoplasma escasso. Também no sangue periférico são vistas células linfoides pleomórficas com endentação (Figuras 4.198 a 4.201).

No LCM, não se observa a transformação para linfoma de grandes células. Contudo, pode haver em 20% dos casos a conhecida forma blastoide deste linfoma.

Embora o LCM seja de baixo grau, caracteriza-se por um mau prognóstico, sendo necessários regimes e tratamento correntes, como ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, vincristina e prednisolona (CHOP) ou fludarabina, cada um associado ao rituximab. Este anticorpo monoclonal anti-CD20 tem ação antilinfomatosa e potenciadora da quimioterapia.

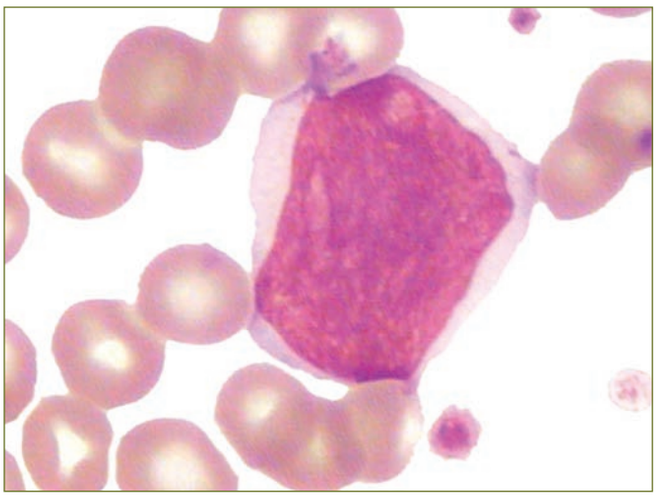


Figura 4.198 LCM: célula linfoide blastoide (2.000×)

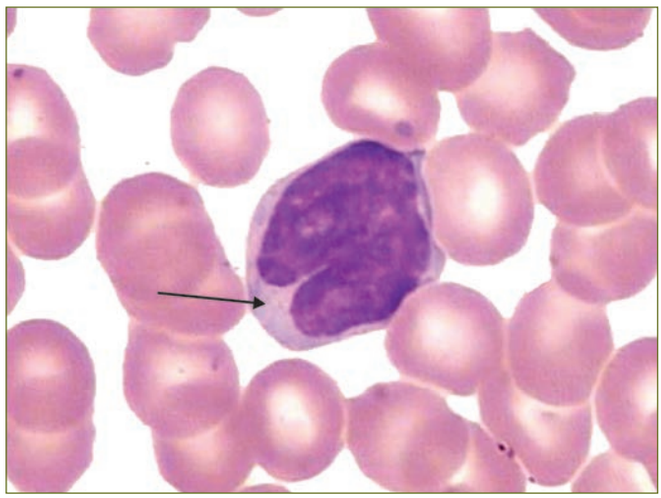


Figura 4.200 LCM: célula linfoide com endentação (*seta*) (2.000×)

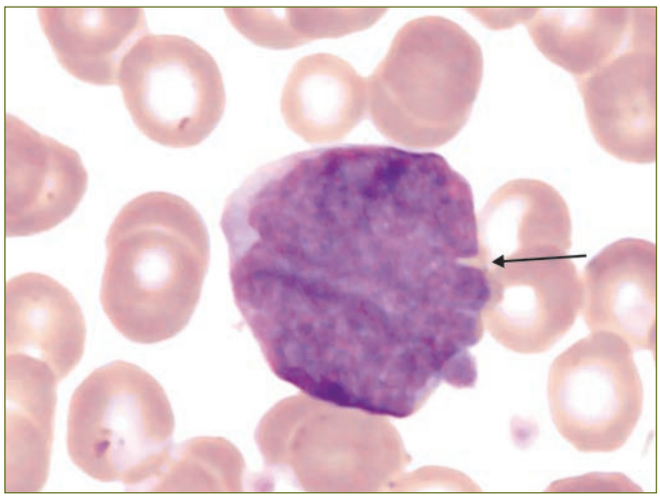


Figura 4.199 LCM: célula linfoide com endentação (*seta*) (2.000×)

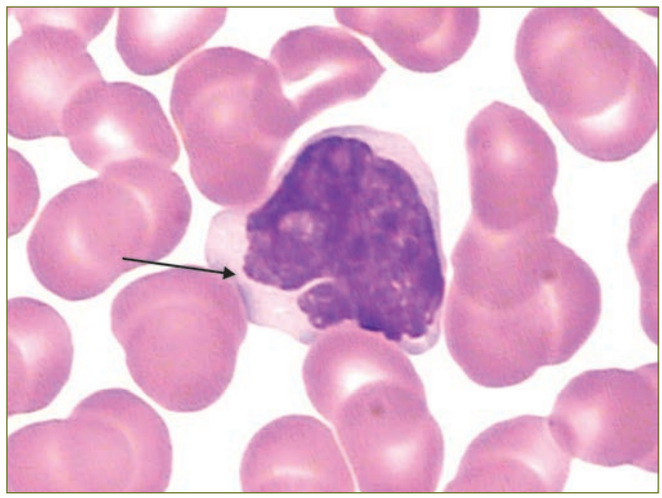


Figura 4.201 LCM: célula linfoide com endentação (*seta*) e nucléolo (2.000×)

Provavelmente, os efeitos do rituximab devem-se à toxicidade celular, intermediada pelo complemento e pelo anticorpo, que inibem a proliferação celular e induzem a apoptose.

No fenótipo tumoral da LCM, as células neoplásicas expressam antígenos de superfície de linhagem B (CD19, CD20, e CD79a), bem como IgM/D de superfície com restrição clonal de cadeias leves. Entretanto, a expressão dos CD23 e CD10 é negativa. Isso possibilita um diagnóstico diferencial com outras doenças linfoproliferativas B crônicas.

A maioria dos pacientes com LCM apresenta o genótipo tumoral t(11;14). Essa translocação promove a superexpressão da proteína indutora do ciclo celular ciclina D1. Alguns pacientes podem apresentar a mutação P53. Este gene promove um pior prognóstico. A célula normal correspondente do LCM é o linfócito virgem (*naïve*) que forma a zona do manto.

Linfoma folicular

Entre os linfomas não Hodgkin, o linfoma folicular é o mais frequente no Brasil e também nos EUA. Tem evolução indolente e é incurável. No entanto, a doença pode ser benigna durante muitos anos, com sobrevida média a partir do diagnóstico em torno de 9 anos.

A faixa etária de incidência do linfoma folicular é entre 50 e 60 anos de idade, sendo muito difícil que ocorra algum caso abaixo de 25 anos. Todos os elementos do centro germinativo do linfonodo são encontrados com composição celular polimorfa. A proporção de centrócitos e centroblastos varia entre os pacientes e as áreas nodulares comprometidas são diferentes.

Geralmente, os pacientes com linfoma folicular apresentam linfonodopatias indolores, quase sempre generalizadas. A maior parte dos pacientes é diagnosticada nos estádios III ou IV da doença. Nesse linfoma, pode ocorrer transformação maligna, em tumores difusos agressivos, com fases leucêmicas.

O tratamento com radioterapia é utilizado no linfoma folicular em pacientes com doença localizada, com ótimas respostas. Na doença disseminada, o tratamento varia de simples observação até quimioterapia com clorambucila ou CPV (ciclofosfamida, vincristina e prednisona) com resposta em até 90% dos pacientes. Isoladamente, a fludarabina ou em combinação com ciclofosfamida ou mitoxantrona e dexametasona é outra opção no tratamento. O rituximab é muito eficaz e pode ser usado individualmente ou em combinação com quimioterapia. Inicialmente, a recidiva do linfoma folicular é tratada com a mesma terapêutica, porém a doença torna-se mais difícil de controlar, exigindo quimioterapia mais intensa e anticorpos marcados em doses maiores.

Em pacientes com história de pelo menos uma recidiva, o transplante autólogo de células-tronco pode ter um grande valor. Enquanto isso, o transplante alogênico pode curar pacientes mais jovens.

No linfoma folicular, os linfócitos tumorais expressam antígenos de superfície de linhagem B (CD19, CD20 e CD79a), além de IgM ou IgD de superfície com restrição clonal de cadeias leves. É observada também a expressão dos CD10 e da oncoproteína bcl-2 na maioria dos pacientes.

Os achados genéticos incluem a t(14;18) em quase 90% dos pacientes com linfoma folicular. Essa translocação resulta na expressão da oncoproteína bcl-2, que é capaz de impedir a apoptose.

No linfoma folicular, é comum o envolvimento do sangue periférico com o surgimento de células linfoides clivadas (Figuras 4.202 e 4.203). As células normais correspondentes são os centrócitos e os centroblastos do centro germinativo.

Linfoma de células da zona marginal extranodal (tipo MALT)

Este linfoma apresenta-se em todos os sítios primários, porém é mais frequente no estômago, no pulmão, na tireoide, na glândula salivar e na glândula lacrimal. O linfoma de células da zona marginal extranodal (tipo MALT) gástrico é a forma mais comum, sendo precedido por infecção por *Helicobacter pylori*. No estágio inicial da doença, o tratamento com antibiótico pode eliminar o *H. pylori*. Entretanto, a quimioterapia combinada com rituximab e a radioterapia podem ser necessárias. Esse linfoma é mais frequente em pacientes portadores de síndrome de Sjögren e tireoidite de Hashimoto.

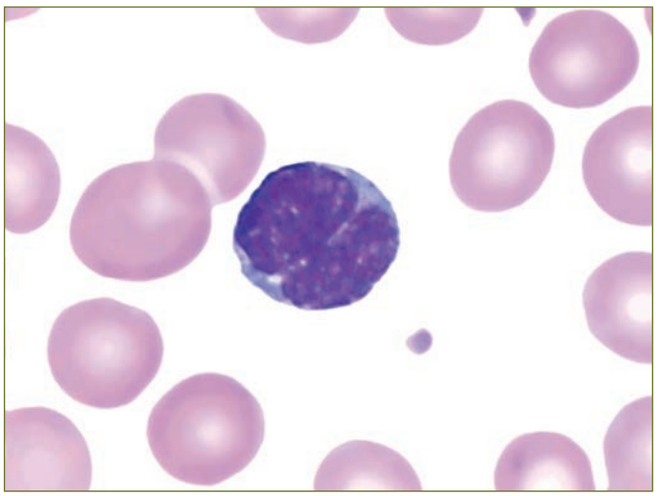


Figura 4.202 Linfoma folicular: célula linfoide clivada (2.000×)

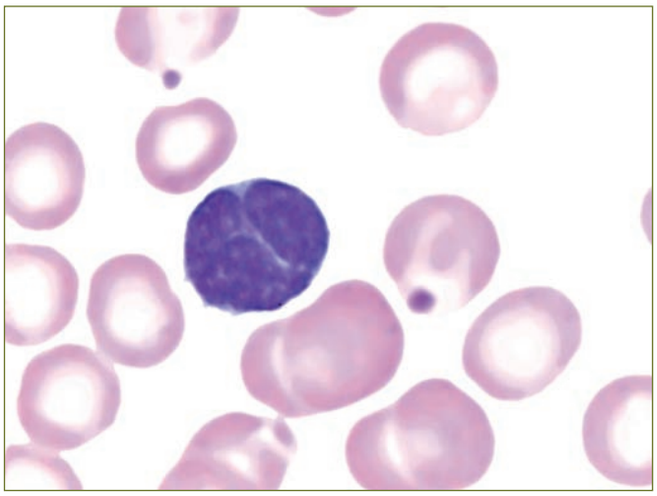


Figura 4.203 Linfoma folicular: célula linfoide clivada (2.000×)

A maioria dos linfomas da zona marginal é extranodal com aspectos clínicos e morfológicos dos linfomas de tecido linfoide associado a mucosas (MALT). As células neoplásicas do linfoma de células da zona marginal têm tropismo pelo epitélio, levando à conhecida lesão "linfoepitelial".

O imunofenótipo da doença expressa imunoglobulinas IgM maiores que a IgG e esta maior é que a IgA, mas são IgD negativos. Entretanto, o mais importante no diagnóstico diferencial é a não expressão dos marcadores CD5, CD10 e CD76 e a oncoproteína bcl-1.

Além disso, o linfoma de células da zona marginal pode sofrer transformação para linfomas de alto grau. Não há achado genético característico para este tipo de linfoma.

Linfoma de linfócitos pequenos/leucemia linfocítica crônica B

O linfoma de linfócitos pequenos é mais frequente em adultos, sendo comum o paciente apresentar linfoadenopatia generalizada. É característico o envolvimento com a medula óssea e o sangue periférico e costuma haver hepatoesplenomegalia, podendo evoluir para linfoma difuso de grandes células B, conhecido como síndrome de Richter.

As células neoplásicas deste linfoma apresentam antígenos de células B (CD19, CD20 e CD79a) e um marcador de células T, o CD5. A expressão de imunoglobulinas de superfície confirma a monoclonidade da proliferação linfocitária.

O achado genético característico é o rearranjo clonal do gene de imunoglobulina. Cerca de 50% dos pacientes apresentam anormalidades cariotípicas como a trissomia do 12 e a translocação t(14;19), envolvendo o oncogene bcl-3 no cromossomo 19.

Os aspectos morfológicos desse linfoma apresentam um apagamento na arquitetura normal do linfonodo, por proliferação de pequenos linfócitos com semelhança aos linfócitos normais. Na medula óssea, o comprometimento pode ser nodular, intersticial ou difuso.

Na leucemia linfocítica crônica B, há uma proliferação de pequenos linfócitos muito semelhante aos linfócitos normais. No esfregaço do sangue periférico, essas células apresentam morfologia semelhante aos linfócitos da leucemia linfocítica crônica T, mas no linfoma não se observam manchas nucleares, como é frequente na leucemia (Figuras 4.204 e 4.205).

A célula normal correspondente é o linfócito B periférico.

Plasmacitoma

A principal característica deste linfoma é a proliferação de plasmócitos em diferentes graus de diferenciação (maturação). O plasmacitoma, quando disseminado, é conhecido como mieloma múltiplo.

Este linfoma é bastante raro e ocorre com mais frequência em sítios extranodais. Alguns plasmacitomas podem apresentar células irregulares, sendo denominados mieloma anaplásico.

O plasmacitoma apresenta um imunofenótipo característico, expressando o CD79a, enquanto o CD45 é negativo. A célula normal correspondente é o linfócito B de memória.

Linfoma esplênico da zona marginal

Neste linfoma, não ocorre linfoadenopatia periférica, e sim esplenomegalia, além de ser normal o envolvimento com a medula óssea e o sangue periférico. Ocorre mais frequentmente no adulto, o curso é indolente e a esplenectomia leva a um longo tempo de remissão.

No sangue periférico, geralmente se observa uma discreta linfocitose. As células neoplásicas pleomórficas (células vilosas) são pequenos linfócitos da zona do manto e grandes linfócitos da zona marginal (Figuras 4.206 a 4.209).

As células vilosas são linfócitos com alterações no citoplasma com alguma semelhança aos linfócitos da tricoleucemia, embora as alterações (projeções) citoplasmáticas nas células vilosas sejam polares. No entanto, a maior diferença entre as células do linfoma esplênico da zona marginal (LEZM) e da tricoleucemia está na cromatina, pois os linfócitos do LEZM mostram cromatina mais densa que os linfócitos da tricoleucemia.

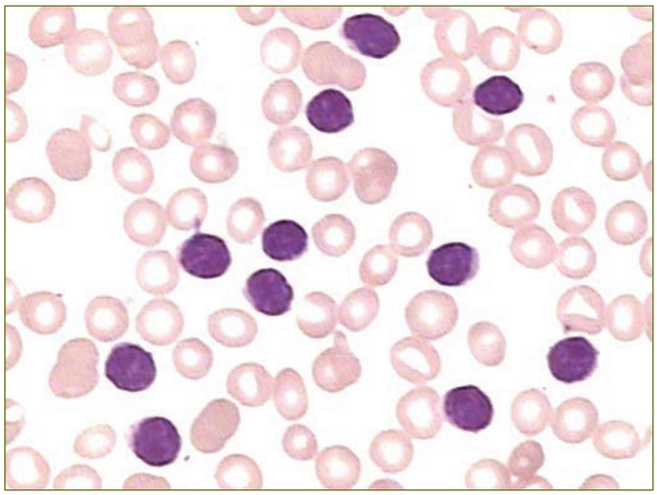


Figura 4.204 Linfoma de linfócitos pequenos/leucemia linfocítica

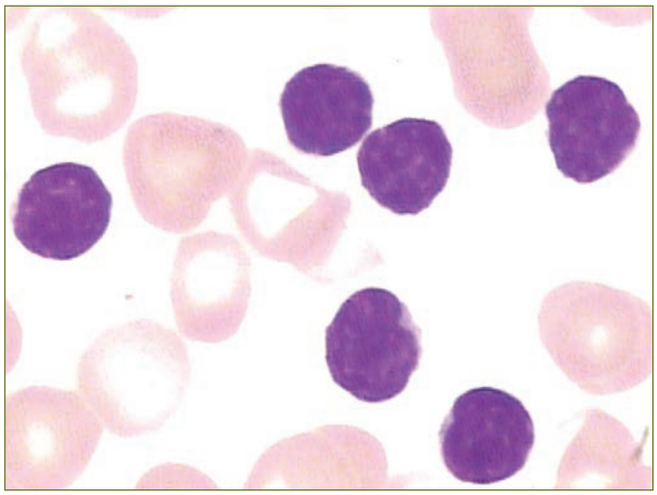


Figura 4.205 Linfoma de linfócitos pequenos/leucemia linfocítica crônica de linfócitos pequenos (2.000×)

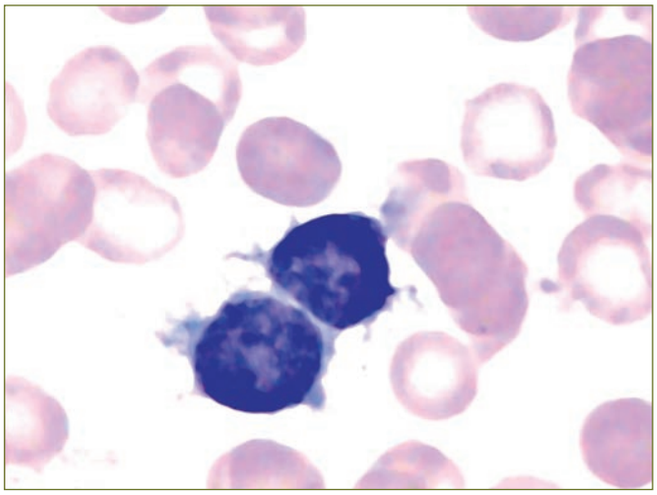


Figura 4.206 LEZM: linfócitos vilosos com cromatina densa e projeções citoplasmáticas polares (2.000×)

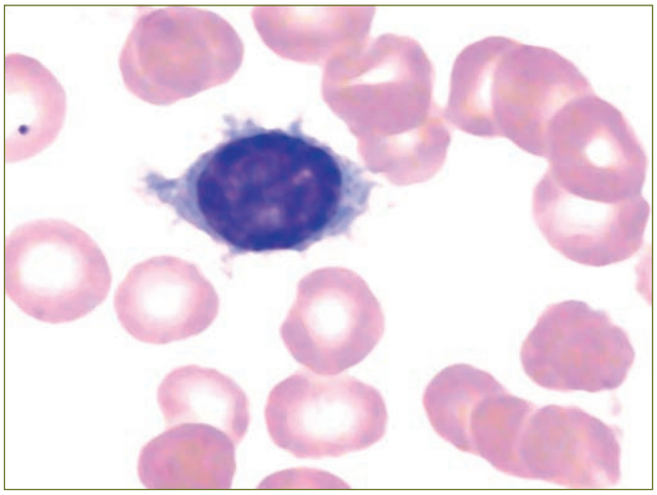


Figura 4.208 LEZM: linfócito viloso com cromatina densa e projeções citoplasmáticas polares (2.000×)

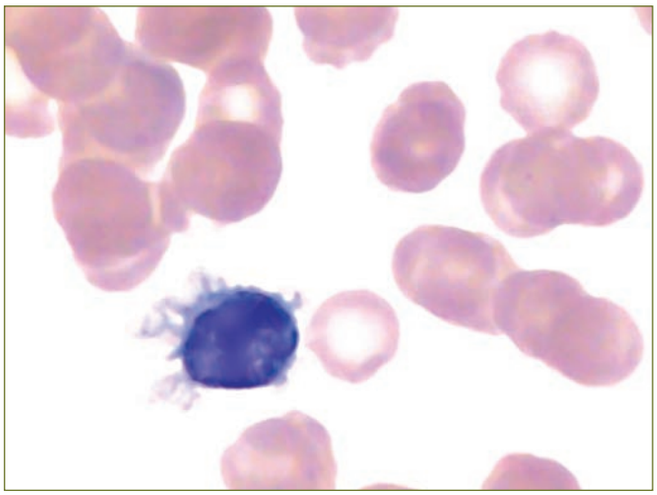


Figura 4.207 LEZM: linfócito viloso com cromatina densa e projeções citoplasmáticas polares (2.000×)

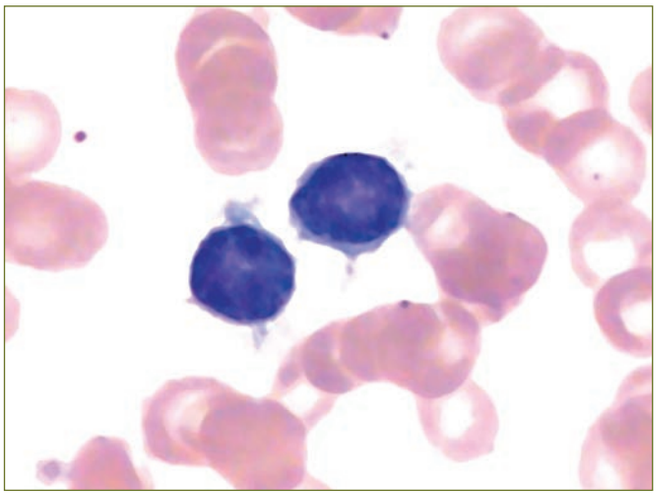


Figura 4.209 LEZM: linfócitos vilosos com cromatina densa e projeções citoplasmáticas polares (2.000×)

O tratamento é indicado quando há sintomas clínicos importantes e baseia-se no uso de quimioterapia e/ou anticorpos monoclonais. A cirurgia (esplenectomia) ainda é considerada em alguns casos. Os pacientes portadores de LEZM apresentam, na maioria dos casos, bom prognóstico.

O LEZM já foi correlacionado com a sorologia positiva para o vírus da hepatite C, apresentando casos de remissão completa do linfoma após tratamento para erradicação do vírus da hepatite C. Este tipo de linfoma apresenta um imunofenótipo pouco característico, com os CD5, CD10, CD23, CD76 e o bcl-2 negativos, e os marcadores de células B, CD19, CD20 e CD79a positivos. No LEZM, o achado genético mais frequente é a trissomia 13.

Linfoma difuso de grandes células B

Este linfoma é bastante agressivo, mas responde bem a quimioterapia, com remissão completa na maioria dos casos. Em 50% dos pacientes, há uma sobrevida longa e livre da doença. Este linfoma é mais frequente em mulheres jovens.

O linfoma difuso de grandes células B (LDGC) é mais frequente em pacientes com menos de 60 anos de idade, embora ocorra em qualquer faixa etária. O LDGC acomete principalmente os sítios nodais, porém pode causar infiltração secundária de sítios extranodais.

Pode ainda apresentar-se como doença primária extranodal, sendo o trato gastrointestinal, o sistema nervoso central e a pele os sítios mais frequentemente acometidos. Em pacientes imunossuprimidos ou em portadores de AIDS, a incidência do LDGC é maior.

Durante muitos anos, o tratamento básico para o LDGC foi o CHOP. Após o rituximab (anti-CD20), a perspectiva de cura aumentou. No momento, o R-CHOP é o tratamento inicial da doença.

As células tumorais da LDGC expressam antígenos de superfície de linhagem B (CD19, CD20 e CD79a) e também as IgM e IgG de superfície com restrição clonal de cadeias leves. A maioria dos casos pode apresentar expressão nuclear da proteína bcl-6.

No genótipo tumoral do LDGC, não há alterações citogenéticas específicas, porém mais de 30% dos pacientes apresentam a translocação t(14;18). Junto ao linfoma folicular, o LDGC responde pela maioria de todos os casos de linfomas.

Na doença, há uma proliferação de grandes células blásticas com cromatina frouxa, nucléolo proeminente e citoplasma basofílico, semelhantes aos imunoblastos. No sangue periférico, observa-se em alguns casos uma evidente linfocitose, com células linfoides grandes de cromatina difusa (Figuras 4.210 e 4.211). A célula normal correspondente é a célula B proliferativa do centro germinativo.

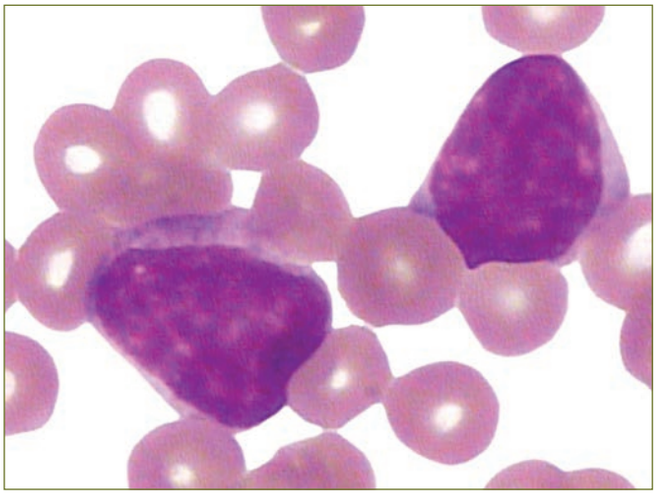


Figura 4.210 LDGC: células linfoides grandes com cromatina difusa (2.000×)

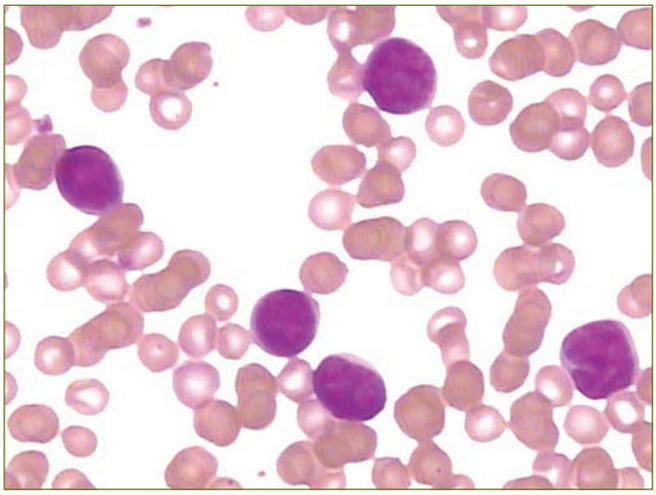


Figura 4.211 LDGC: células linfoides grandes com cromatina difusa (800×)

Linfomas não Hodgkin de células T

Estes linfomas correspondem a 10% a 15% de todos os linfomas, porém no Japão a incidência é de aproximadamente 40% devido à associação ao HTLV-1. A evolução dos linfomas não Hodgkin de células T é mais grave que os linfomas de células B. Assim, a doença tem mau prognóstico.

Micose fungoide/síndrome de Sézary

Este linfoma cutâneo apresenta-se com nódulos ou placas e geralmente eritrodermia generalizada. A micose fungoide é uma rara doença de comportamento clínico indolente com apresentação primária cutânea.

Os linfócitos cerebriformes com sua morfologia característica do linfoma infiltram-se na derme superior (epidermotropismo), formando os microabscessos de Pautier. A linfoadenopatia não é comum, mas quando presente tem mau prognóstico.

A síndrome de Sézary é considerada uma variante agressiva da micose fungoide. É característico nesse linfoma o acometimento difuso da pele (eritrodermia), além de associação a linfonodomegalia generalizada e mais de 50% de células tumorais (linfócitos cerebriformes).

As células tumorais típicas da MF/SS expressam antígenos T, como CD2, CD3 e CD5. No entanto, na maioria dos casos, expressa o CD4 e tem ausência de CD7.

O genótipo tumoral da micose fungoide/síndrome de Sézary (MF/SS) apresenta rearranjo dos genes do receptor de células T. Outras alterações cromossômicas também podem ser encontradas nesse linfoma. A MF/SS não apresenta alterações genotípicas características.

Nesse linfoma, o estagiamento utilizado basei-a-se na apresentação clínica, diferenciando-se do sistema de estagiamento utilizado nos outros linfomas não Hodking. Geralmente, os pacientes que apresentam eritrodermia e lesões tumorais têm prognóstico menos favorável e os que evoluem para envolvimentos extracutâneo têm prognóstico mais reservado.

O tratamento com quimioterapia sistêmica é para casos com doença cutânea avançada ou envolvimento extracutâneo. Nos pacientes com lesões cutâneas iniciais, sem envolvimento extracutâneo, o tratamento é geralmente tópico.

Os linfócitos apresentam cromatina grossa e grumosa, sem nucléolo, e com evidente pleomorfismo celular com aspecto característico (linfócito cerebriforme). Essas células no sangue periférico são chamadas de células de Sézary (Figuras 4.212 a 4.215).

A célula normal correspondente é o linfócito T epidermotrópico CD4+.

Linfoma/leucemia de células T do adulto

Inicialmente descrita no Japão, esta doença, associada ao retrovírus HTLV-1, é frequente também nos EUA e no Caribe. Exibindo um quadro leucêmico e linfoadenopatia generalizada, o linfoma na forma aguda é bastante agressivo. Geralmente, a sobrevida é abaixo de dois anos. O linfoma ocorre em pessoas na faixa etária de 40 a 50 anos, porém apenas 3% a 5% dos indivíduos infectados pelo vírus HTLV desenvolvem a doença.

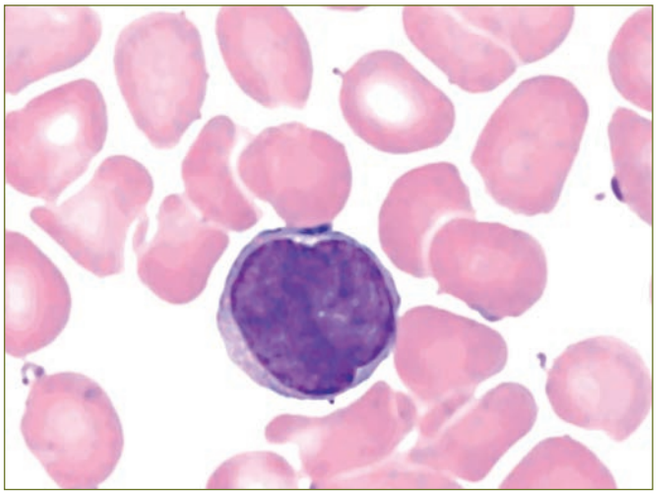


Figura 4.212 Síndrome de Sézary: célula linfoide convoluta de aspecto cerebriforme (2.000×)

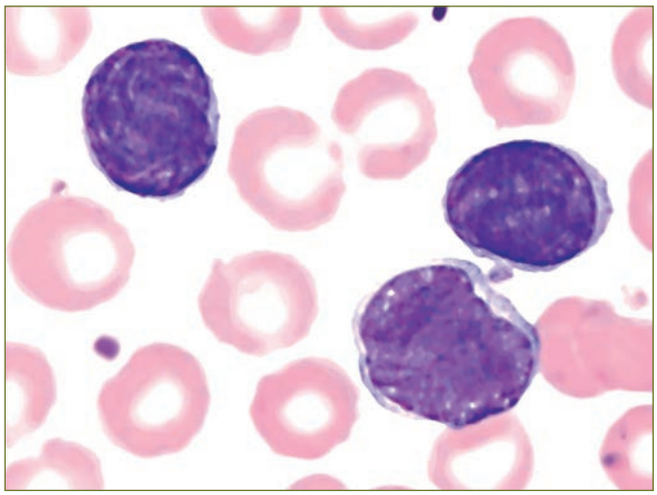


Figura 4.214 Síndrome de Sézary: células linfoides convolutas de aspecto cerebriforme (2.000×)

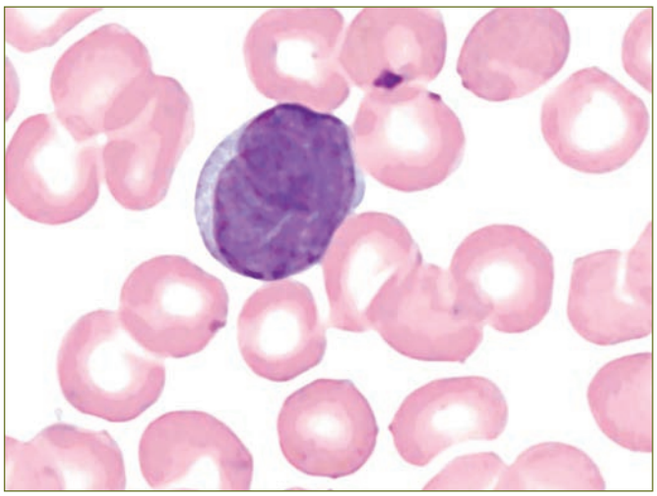


Figura 4.213 Síndrome de Sézary: célula linfoide convoluta de aspecto cerebriforme (2.000×)

É uma neoplasia que pode apresentar-se na forma de leucemia ou linfoma. O linfoma/leucemia de células T do adulto (ATLL) apresenta-se com quatro formas clínicas bem definidas: aguda, linfomatosa, crônica e *smoldering*. A forma aguda é a mais comum e está associada à grande quantidade de células tumorais circulantes, linfadenopatia generalizada e ausência de hipercalcemia. A forma crônica apresenta-se com linfocitose persistente, de curso indolente, podendo estar associada a lesões cutâneas e pulmonares. A forma *smoldering* apresenta menos de 5% de células pleomórficas circulantes e contagens de linfócitos normais. Todas as formas estão associadas a infecção crônica pelo vírus HTLV-1.

No fenótipo tumoral do ATLL, as células tumorais são células T periféricas que expressam CD2, CD3 e CD4, mas são negativas para CD7 e CD8. Essas células também expressam grande quantidade de CD25 (receptor de IL-2). O DNA das células neoplásicas mostra integração monoclonal do retrovírus HTLV-1. A maioria dos pacientes com ATLL apresenta rearranjo dos genes do receptor de células T.

A morfologia celular é bastante diversificada, com aspectos e tamanhos celulares bastante variáveis. As células podem ser pequenas com núcleos densos, ou grandes e bizarras com núcleos hiperlobulados de aspecto pleomórfico e convoluto (*flower cells*) – células em trevo (Figuras 4.216 a 4.219).

O achado genético é o HTLV-1, que integra a célula neoplásica. Na maioria dos casos de ATLL, há envolvimento cutâneo geralmente caracterizado por intenso epiteliotropismo.

Leucemia pró-linfocítica de células T

Geralmente, este tipo de doença não envolve os linfonodos primários, sendo característico o quadro leucêmico com ou sem linfoadenopatia. A leucemia linfocítica pró-linfocítica de células T é diferente da LLC-B (tipo B), entre outros aspectos, por não formar centros proliferativos. Existem casos com atipia celular evidente.

Outra característica da leucemia pró-linfocítica de células T é a infiltração no baço, na medula óssea e no sangue periférico, com intensa leucocitose com linfocitose, apresentando contagens superiores a 100.000 células/mm^3. As células tumorais são grandes, de núcleo arredondado ou ovalado com nucléolo evidente. O citoplasma é abundante, basofílico e agranular. Em alguns casos, observa-se a presença de *bubble* nas células neoplásicas.

A maioria das células neoplásicas da leucemia pró-linfocítica é positiva para CD2, CD3, CD7 e CD4. Em 25% dos pacientes, pode haver coexpressão de CD4 e CD8.

O genótipo tumoral da doença apresenta rearranjo dos genes do receptor de células T. A maioria dos pacientes apresenta anormalidades nos cromossomos 14, 8 e 12. A célula normal correspondente é o linfócito T maduro.

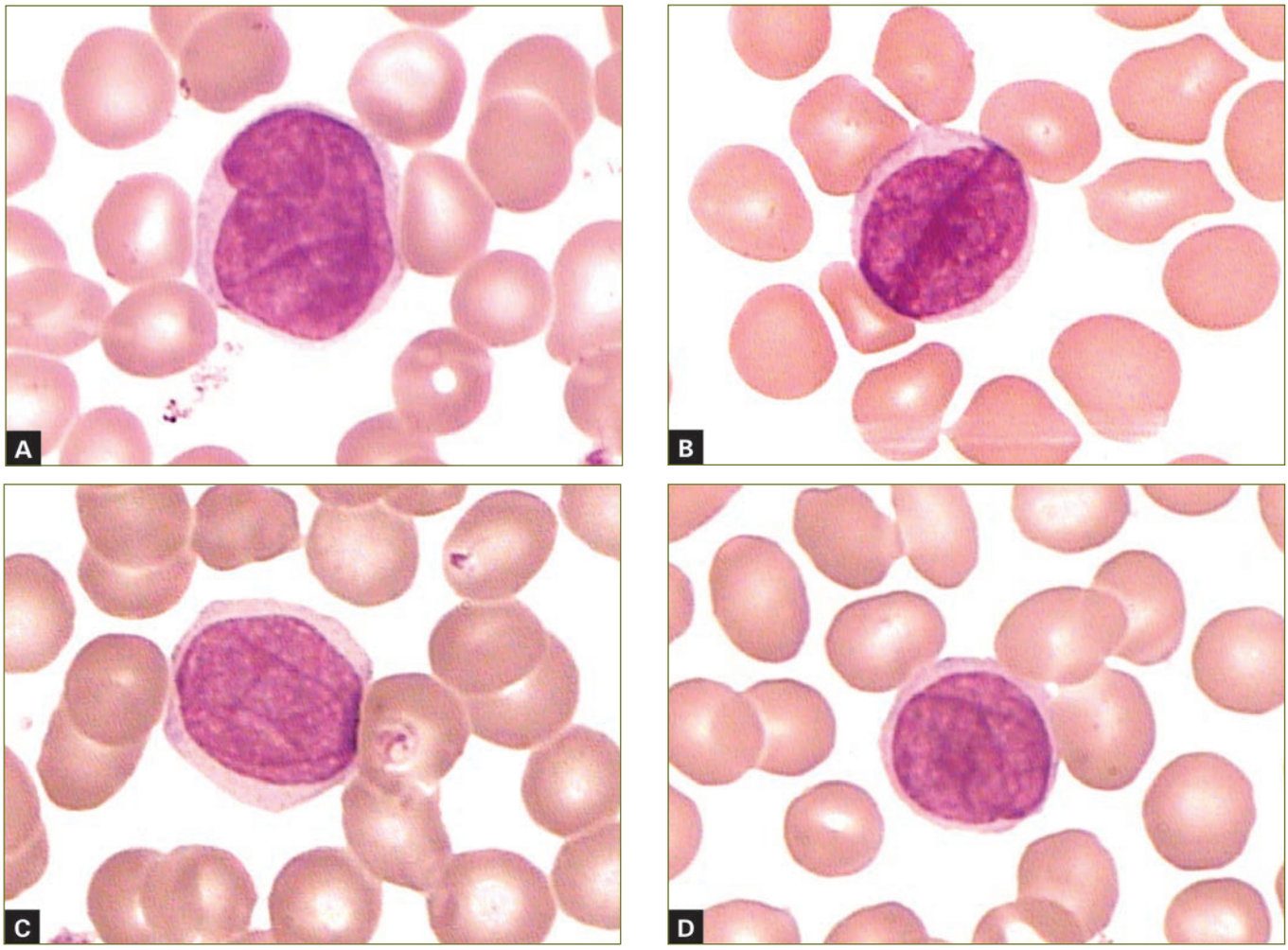


Figura 4.215 (**A** a **D**) Síndrome de Sézary: células linfoides convolutas de aspecto cerebriforme (2.000×)

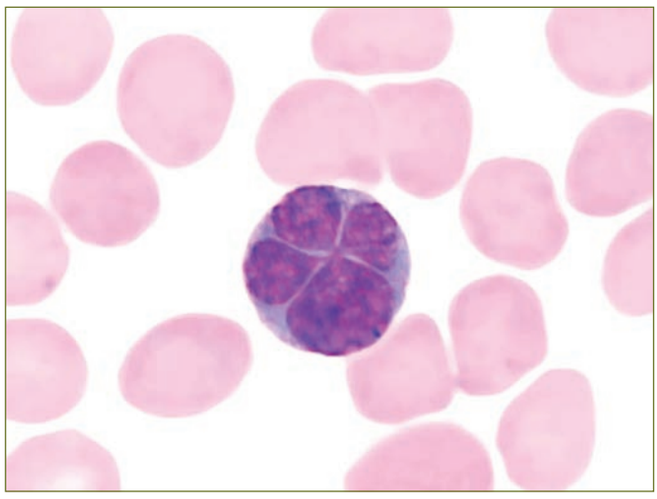


Figura 4.216 ATLL: célula linfoide pleomórfica e convoluta (*flower cell*) (2.000×)

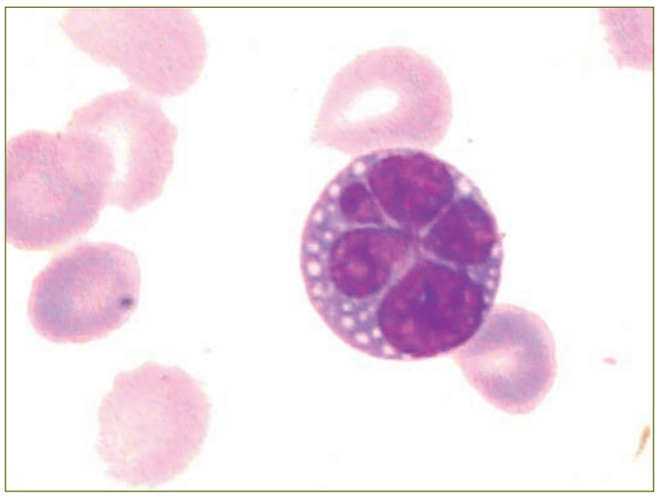


Figura 4.217 ATLL: célula linfoide pleomórfica e convoluta (*flower cell*) (2.000×)

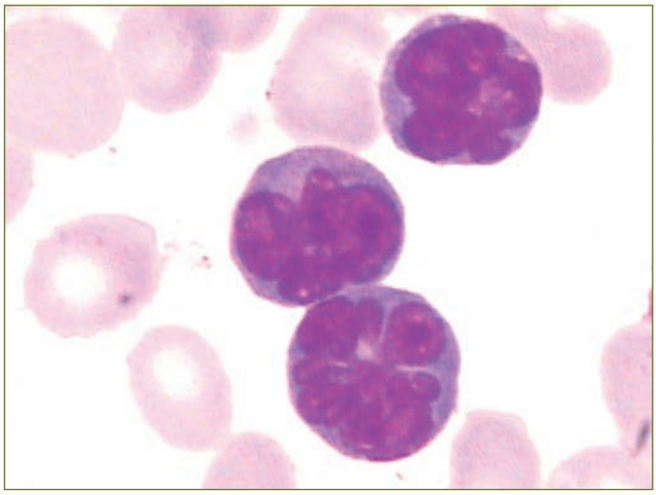


Figura 4.218 ATLL: células linfoides pleomórficas e convolutas (2.000×)

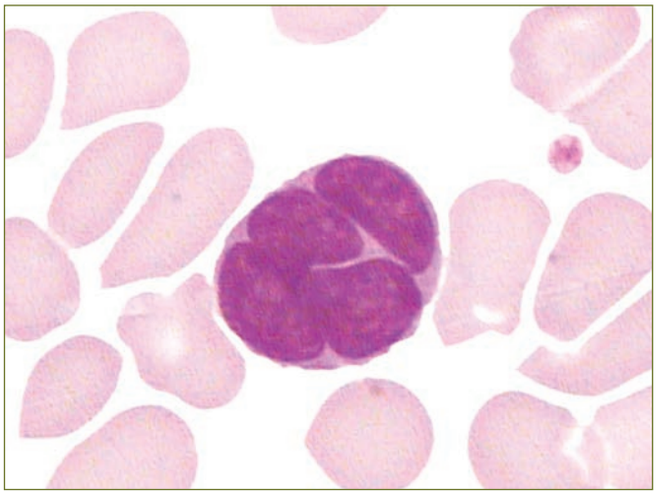


Figura 4.219 ATLL: célula linfoide pleomórfica e convoluta (2.000×)

Linfomas de células T periféricas sem outras especificações

Estes linfomas são mais frequentes em homens adultos e, geralmente, há linfoadenopatia generalizada, envolvimento da medula óssea e hepatoesplenomegalia. É o tipo mais comum de linfoma não Hodgkin de fenótipo T.

Os linfomas de células T periféricas (LTP) formam um grupo de neoplasias heterogêneas que não se identificam com nenhuma entidade clinicopatológica bem definida. Assim, a composição celular é heterogênea com mistura de células pequenas e grandes em proporções variáveis. O infiltrado inflamatório é um achado comum e frequentemente observado na região paracortical.

O curso clínico das doenças é muito agressivo, porém os LTP respondem bem à quimioterapia. A sudorese noturna, a perda de peso e os infiltrados inflamatórios são bastante comuns. O LTP pode apresentar-se como doença nodal agressiva, frequentemente associado a infiltrações extranodais na pele e no sistema nervoso central, por exemplo.

Os antígenos de superfície de linhagem T (CD2, CD3, CD5 e CD7) são expressos nas células tumorais desse linfoma, porém a maioria é positiva para CD4 e negativa para CD8. Nos LTP, os fenótipos aberrantes são comuns.

O genótipo tumoral nesse linfoma não apresenta alterações genotípicas características e a maioria dos pacientes apresenta rearranjo dos genes do receptor de células T. A célula normal correspondente é o linfócito T periférico.

Linfoma de células T tipo paniculítico subcutâneo

É um linfoma muito raro caracterizado pelo surgimento de nódulos subcutâneos nas extremidades. A clínica é bastante variável, apresentando nódulos de tamanho pequeno a grande, com aspecto necrótico. Este linfoma, às vezes, não apresenta atipias celulares, sendo mal diagnosticado como "paniculite inespecífica".

A complicação principal deste linfoma é a síndrome hemofagocítica, que leva à morte caso o paciente não responda bem à quimioterapia. Não se observa a disseminação linfonodal neste linfoma, porém a infiltração histocitária é intensa nas áreas de necrose.

Este linfoma expressa nas células neoplásicas os marcadores tumorais CD3 e CD8. A maioria dos pacientes apresenta o rearranjo clonal do gene TCR.

O tratamento do linfoma de células T tipo paniculítico subcutâneo pode ser feito com terapia de radiação local ou quimioterapia sistêmica. A sobrevida é de 5 anos em média, em mais de 80% dos pacientes.

A morfologia celular é bastante variável, com predomínio de células pequenas. Em outras ocasiões, há misturas de diversos tipos celulares.

Linfoma T angioimunoblástico

O linfoma T associado à linfadenopatia angioimunoblástica é mais comum nos homens, com idade de maior incidência entre a sexta e a sétima décadas de vida. Inicialmente, foi classificado como hiperplasia linfoide atípica, porém, como a maioria dos casos evolui para linfoma, logo foi reconhecido como linfoma.

A febre, a perda de peso, a hipergamaglobulinemia, as erupções cutâneas e o achado marcante, que é a proliferação vascular de vênulas pós-capilares, caracterizam esse linfoma, o qual quase sempre evolui para doença progressiva. A sobrevida é de até cinco anos.

O fenótipo tumoral no linfoma T angioimunoblástico apresenta células neoplásicas que expressam marcadores de células T e geralmente são CD4 positivas. Relata-se a associação entre esse linfoma com viroses linfotrópicas, como herpesvírus humano, vírus da hepatite C, HIV e EBV.

O diagnóstico diferencial do linfoma T angioimunoblástico envolve pesquisa de várias infecções virais e distúrbios

vasculares. A análise do aspirado de medula óssea e a biópsia do linfonodo definem o diagnóstico.

Aproximadamente 70% dos pacientes com este linfoma apresentam aberrações cromossômicas clonais. Um achado importante é a celularidade diminuída. Geralmente, este tipo de linfoma progride para linfoma imunoblástico T.

Linfoma angiocêntrico

A principal característica do linfoma angiocêntrico são as lesões nasais na linha média. O EBV costuma estar associado a esse processo patológico. Esse linfoma apresenta um mau prognóstico, com sobrevida média entre 12 e 18 meses.

O linfoma angiocêntrico é uma neoplasia linfoide rara nos EUA e na Europa, porém muito comum na Ásia e em comunidades hispânicas. Também é bastante vista neste linfoma a destruição do palato com edema de face.

Este linfoma é comum em vários sítios primários, como pele, trato respiratório superior, tecidos moles cutâneos e testículos. Os aspectos das lesões são necróticas, ulceradas com infiltrado linfocitário pleomórfico, angioinvasivo e associado a células inflamatórias. Por vezes, são necessárias várias biópsias para se definir o diagnóstico da doença. Em todos os casos de linfoma angiocêntrico, os testes demonstram a presença do EBV. Quimioterapia e radioterapia podem ser úteis no tratamento desse linfoma.

As células neoplásicas expressam um imunofenótipo caracterizado por CD2, CD45RO+ e CD56. Os marcadores de células citotóxicas, como perforina, granzima e TIA-1, são positivos. Ausência de rearranjo para receptores de células T e EBV clonal são as alterações genéticas relatadas no LA.

O componente celular neoplásico é polimórfico com predomínio de células pequenas. A célula normal correspondente é o linfócito NK.

Linfoma de células T do tipo enteropatia

É um linfoma altamente agressivo e tem alto índice de mortalidade (cerca de 80% dos casos), com sobrevida de três anos no máximo. A incidência maior é em adultos e a perfuração do intestino costuma ser a primeira manifestação deste linfoma, que pode estar associada a história prévia de doença celíaca.

O linfoma de céluals T do tipo enteropatia no início era classificado como "histiocitose maligna" do intestino. Essa neoplasia do intestino delgado geralmente se localiza no jejuno e caracteriza-se pelas ulcerações com invasão da camada muscular e perfurações pelas células neoplásicas.

As células tumorais desse linfoma são CD103 positivos, com imunofenótipo de células T, de padrão citotóxico. Tais células apresentam rearranjo clonal de receptores de células T.

A morfologia celular é bastante variável, com células grandes e médias. Um achado importante é o grande número de linfócitos intraepiteliais e nas mucosas adjacentes.

Linfoma anaplásico de grandes células T

Este tipo de linfoma pode ser encontrado em todas as faixas etárias, porém é mais frequente em crianças e adultos jovens. Com uma forma cutânea primária de aspecto histológico característico, o linfoma anaplásico de grandes células (LAGC) difere-se da forma nodal.

A morfologia caracteriza-se pelas células grandes pleomórficas em arranjo sincicial, com nucléolos proeminentes e basofílicos, o que a distingue da célula de Reed-Sternberg (célula da linhagem maligna do linfoma de Hodgkin que não é encontrada no sangue periférico). O núcleo é redondo ou reniforme. Já o citoplasma é abundante com a região do complexo de Golgi bem marcada.

O LAGC consiste em uma neoplasia que expressa constantemente o marcador tumoral CD30, embora geralmente expresse padrão *null* e marcadores T. A presença da proteína ALK-1 é outra característica da doença. Tal proteína é conhecida como cinase do linfoma anaplásico, sendo decorrente do achado genético t(2;5) (p23:q35) característico deste linfoma.

Linfoma hepatoesplênico do tipo gama/delta

Este linfoma é mais comum em jovens do sexo masculino e tem como característica principal intensa hepatoesplenomegalia, sem aumento dos linfonodos. Outro sintoma, não tão comum, mas que pode ocorrer, é o comprometimento cutâneo.

Este linfoma clinicamente é bastante agressivo. Assim, apesar do sucesso inicial da quimioterapia, a sobrevida média é de até três anos.

Este linfoma apresenta o fenótipo de células T do tipo gama/delta e uma morfologia com células de tamanho intermediário, com citoplasma claro, núcleo por vezes irregular, cromatina densa e nucléolo pequeno. O linfoma hepatoesplênico do tipo gama/delta apresenta como achado principal o extenso envolvimento sinusoidal hepático, visto também no baço e na medula óssea.

A etiologia e a patogenia do linfoma hepatoesplênico tipo gama/delta não são conhecidas. Contudo, observa-se aumento na frequência desta doença em pacientes imunodeprimidos, portadores de doenças autoimunes e imunossuprimidos pela terapia de transplante de órgão sólido.

Os aspectos imunofenotípicos mais comuns das células neoplásicas deste linfoma são gama/deltaTCR (gamaTCR1), CD2, CD3, CD56 e TIA-1 positivos, enquanto os CD4, CD5, CD8 e granzime B são negativos. No estudo citogenético, as células neoplásicas apresentam tipicamente o rearranjo do gene TCR.

No sangue periférico, o linfoma hepatoesplênico do tipo gama/delta apresenta trombocitopenia, anemia e leucopenia com discreta linfocitose. Vários linfócitos deste linfoma apresentam núcleos com discreta irregularidade nuclear (Figuras 4.220 e 4.221).

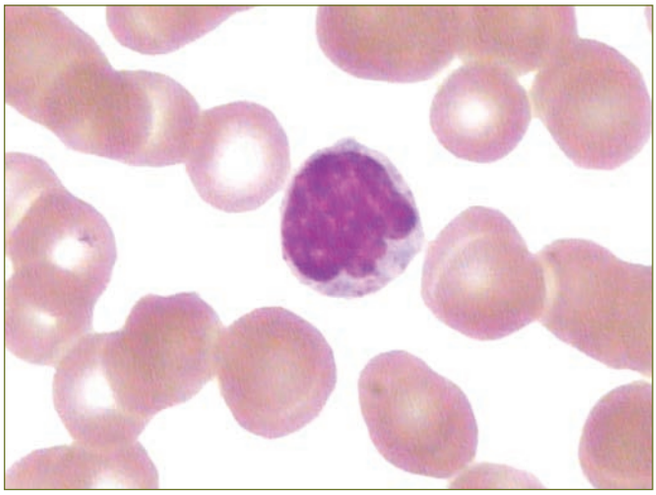


Figura 4.220 Linfoma hepatoesplênico do tipo gama/delta: célula linfoide apresentando discreta irregularidade nuclear (2.000×)

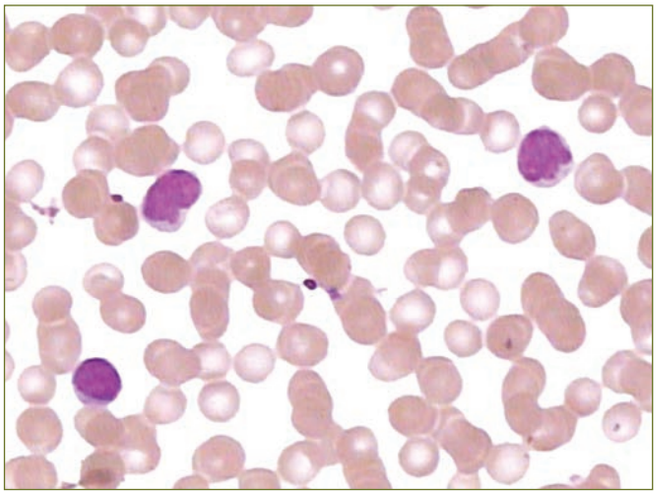


Figura 4.221 Linfoma hepatoesplênico do tipo gama/delta: célula linfoide apresentando discreta irregularidade nuclear (800×)

5

Plaquetas

PLAQUETAS NORMAIS

ESTRUTURA – ANATOMIA FUNCIONAL

As plaquetas, ou trombócitos, medem de 1 a 3μ de diâmetro e são derivadas do citoplasma dos megacariócitos na medula óssea (Figura 5.1). Cada megacariócito origina, em média, 3.000 plaquetas. Quando normais, as plaquetas vivem, em média, 10 dias e são removidas pelo sistema reticuloendotelial do baço e do fígado. Apresentam-se na forma discoide e sem núcleo, mas o citoplasma contém mitocôndrias, numerosos grânulos com diferentes densidades eletrônicas e glicogênio, que é utilizado para obter energia para a plaqueta. No sangue periférico, em que circulam dois terços do total de plaquetas (o restante está no baço), os valores normais são de 150.000 a 450.000 plaquetas/mm^3.

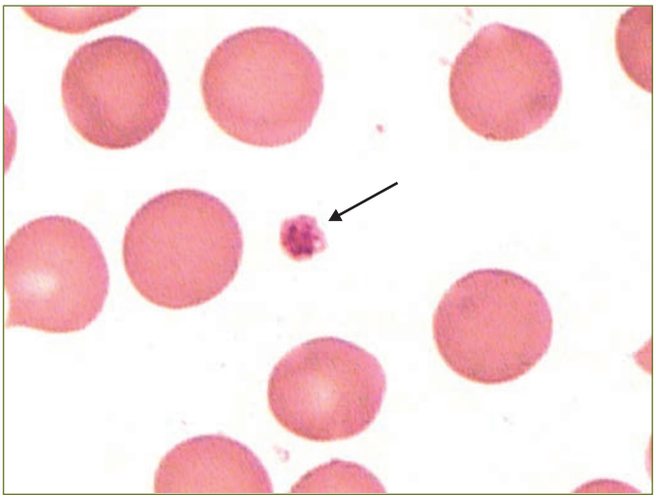


Figura 5.1 Plaqueta normal (*seta*) (2.000×)

Os grânulos densos das plaquetas contêm serotonina, cálcio, reservas de adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP). Já os grânulos alfa, menos densos, contêm fator plaquetário 4, fibrinogênio e tromboglobulina beta. Outros tipos de grânulos, como os lisossomos, que contêm hidrolases ácidas, também são observados nas plaquetas.

Além da manutenção da integridade dos endotélios vasculares, a função das plaquetas na hemostasia primária começa quando ocorre rompimento de um vaso sanguíneo e o fator de von Willbrand adere ao subendotélio servindo de ponte para a adesão plaquetária por meio das glicoproteínas (complexo glicoproteico b-IX-V e GpVI) da membrana. Desse modo, ocorre alteração na morfologia das plaquetas, formando pseudópodos. Nesse momento, as plaquetas recrutam outras, pela ação do tromboxano A2 e ADP, promovendo a agregação plaquetária e a formação do *plug* primário. A exposição das plaquetas ao colágeno, à trombina e ao cálcio faz a fibrina surgir em volta do *plug* de plaquetas, formando o *plug* de fibrina-plaqueta (*plug* hemostático secundário) durante a hemostasia secundária.

Trombopoese

A produção, a diferenciação e a maturação das plaquetas (Figura 5.2) são reguladas primariamente pela trombopoetina. Este fator de crescimento é produzido constantemente em pequenas quantidades nas células do parênquima do fígado e rins e sua taxa de produção depende da taxa de *clearance* dos receptores da trombopoetina (c-Mpl), que está nas plaquetas e nos megacariócitos. Desse modo, a trombopoetina promove o aumento da taxa de endomitose e estimula a maturação megacariocítica. Na endomitose, o material nuclear duplica-se, mas nem o núcleo nem a célula dividem-se. Assim, os megacariócitos podem ficar poliploides e conter

duas vezes (4N) a quantidade normal de DNA (diploide) e até 32 vezes (N=64). A endomitose está também associada à dissolução da membrana celular e à formação de um fuso mitótico multipolar. Na medula óssea, os megacariócitos correspondem a 0,05% a 0,1% das células nucleadas. Outras citocinas, como a IL-3, a IL-6 e a IL-11, podem promover o crescimento e a maturação megacariocítica. Os marcadores imunofenotípicos de plaquetas e megacariócitos são o CD 41 e o CD 42.

No sangue periférico, raramente é observada a existência de megacariócitos, quando há, geralmente na mielodisplasia, leucemia mieloide crônica e trombocitemia essencial estão na forma de "núcleo desnudo" ou em lóbulos com poucas plaquetas aderidas.

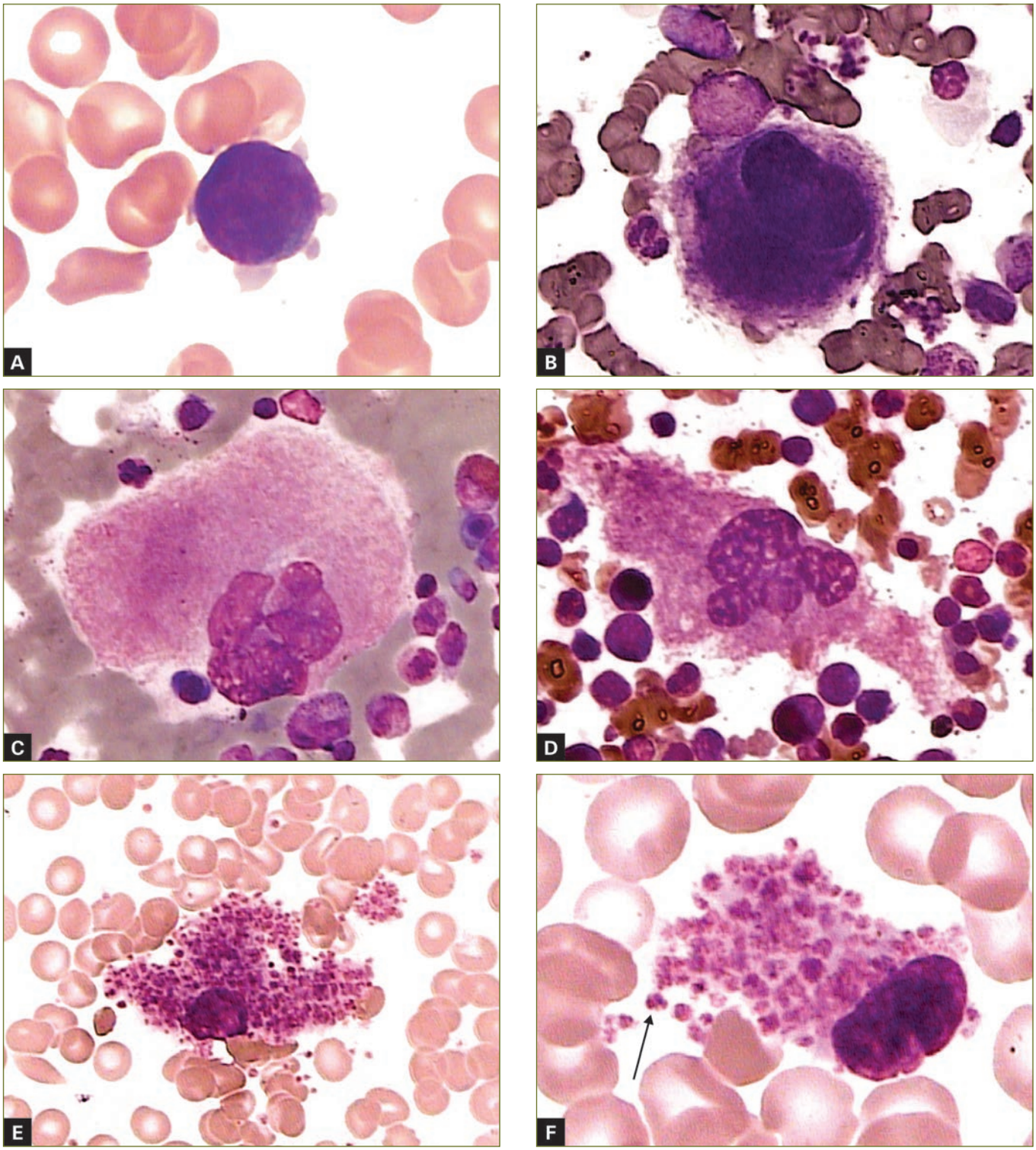


Figura 5.2 (**A** a **F**) Trombopoese, medula óssea. Megacarioblasto (**A**); megacariócito basófilo (**B**); megacariócito acidófilo (**C**); fragmentação do citoplasma do megacariócito acidófilo (**D**); lóbulo nuclear junto às numerosas plaquetas (**E**); e liberação das plaquetas (**F**) (*seta*) (2.000×)

PLAQUETOGRAMA

Os parâmetros plaquetários (Figura 5.3) são importantes no diagnóstico e no tratamento de algumas doenças hematológicas. Eles são fornecidos por equipamentos automatizados, que informam sobre alguns aspectos das plaquetas, como a contagem de plaquetas, o volume plaquetário médio (VPM), o plaquetócrito (PCT) e a amplitude de distribuição das plaquetas (PDW). Os valores normais desses índices são VPM de 6,5 a 9,5fL; PDW 15,2 a 17,7 (*ratio*); e PCT de 0,152% a 0,338%.

O VPM é um índice que tem sido incluído nos hemogramas na maioria dos laboratórios, geralmente por solicitação médica, já que ele representa a média dos volumes de 10.000 plaquetas contadas e avaliadas volumetricamente. É utilizado clinicamente na terapia de púrpuras plaquetárias, síndromes plaquetárias, doenças vasculares e mielodisplasias, entre outras.

ANORMALIDADES NO TAMANHO DAS PLAQUETAS

Quando o tamanho das plaquetas for superior a 4μ de diâmetro, e menor que as hemácias e linfócitos, elas são denominadas macroplaquetas. Entretanto, quando as plaquetas são maiores que estas células, chamam-se plaquetas gigantes (Figura 5.4). O tamanho das plaquetas pode ser avaliado pelo índice automatizado VPM e pela microscopia óptica. Na renovação plaquetária, é comum a formação de macroplaquetas. No entanto, quando um paciente apresenta plaquetopenia sem macroplaquetas, isso pode sugerir um defeito de produção. Na síndrome de Wiskott-Aldrich, observa-se a redução no tamanho das plaquetas, a qual é uma característica dessa doença rara.

ANORMALIDADES NA MORFOLOGIA E NA ESTRUTURA DAS PLAQUETAS

As alterações na morfologia e na estrutura das plaquetas (Figura 5.5) são bastante notáveis no esfregaço do sangue periférico. As plaquetas azul-pálidas ou acinzentadas, sem os grânulos alfa, sugerem um defeito congênito denominado síndrome das plaquetas cinzentas.

As plaquetas degranuladas podem ter várias origens. Na mais frequente, a punção venosa difícil estimula as plaquetas a perder seus grânulos e, em outros casos, os megacariócitos são displásicos, originando plaquetas degranuladas. Outra alteração na morfologia conhecida das plaquetas é a "metamorfose viscosa", uma alteração visível da ativação e da formação de longos pseudópodos. Assim, surgem plaquetas bizarras que aderem a qualquer superfície ou a outras plaquetas (agregação).

TROMBOCITOSE (PLAQUETOSE)

A trombocitose (Figura 5.6) é o aumento no número de plaquetas no sangue periférico, que pode ter etiologia reativa ou primária (essencial). Quando reativa, é resultado de estimulação da medula óssea, como na anemia ferropriva, no hipotireoidismo, em inflamações, e em terapias com corticosteroides, entre outras. Nesses casos, a contagem de plaquetas pode ser superior a 1.000.000 células/mm^3, o que predispõe à trombose. A trombocitose essencial, ou trombocitemia essencial, é um distúrbio mieloproliferativo crônico, caracterizado pela proliferação de megacariócitos na medula óssea. É comum observar alterações no tamanho e contagens que podem ultrapassar 2.000.000 células/mm^3 de plaquetas.

TROMBOCITOPENIA (PLAQUETOPENIA)

Trombocitopenia (Figura 5.7) é a diminuição na contagem de plaquetas no sangue periférico abaixo de 150.000 células/mm^3. Geralmente, quando evidente, está associada a episódios como petéquias, equimoses, hematomas e sangramento anormal (hemorragia). As causas de plaquetopenia mais comuns são: falha na produção por agentes citotóxicos (quimioterapia ou radioterapia), redução da sobrevida (causas periféricas),

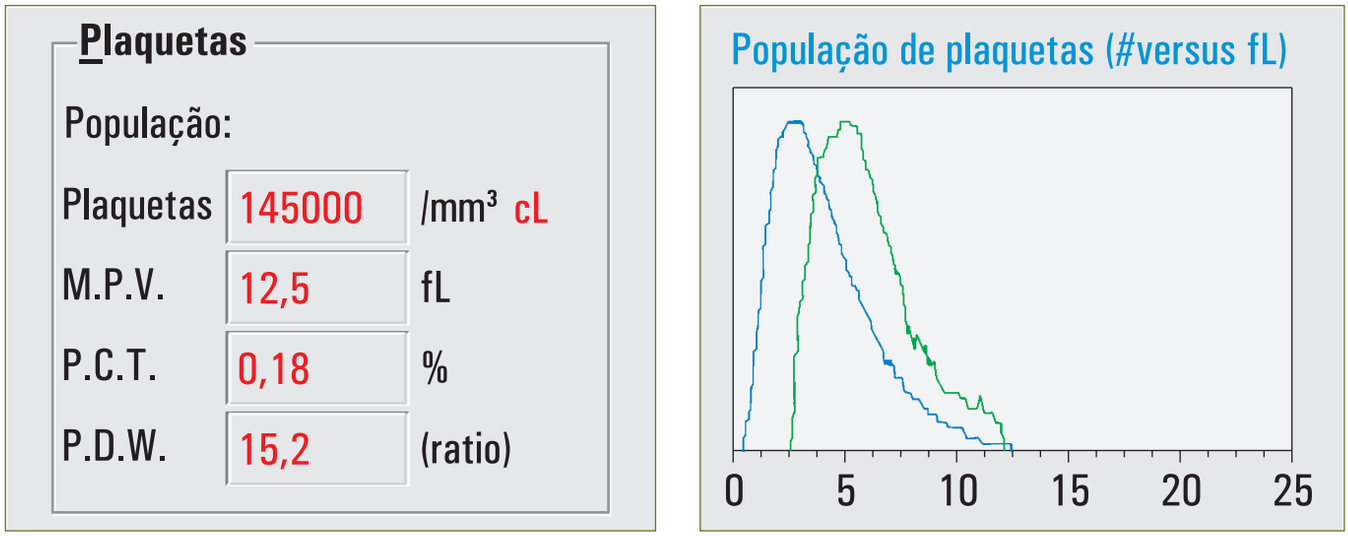


Figura 5.3 Plaquetograma e gráfico de população de plaquetas fornecidas pelos equipamentos hematológicos automatizados. O resultado apresenta uma contagem de plaquetas subnormal (145.000 células/mm^3) e está tarjado de vermelho com aviso na lateral "cL" (*count low*) alertando para a contagem baixa. Além disso, conta com um VPM aumentado de 12,5fL, o que demonstra um crescimento no tamanho das plaquetas

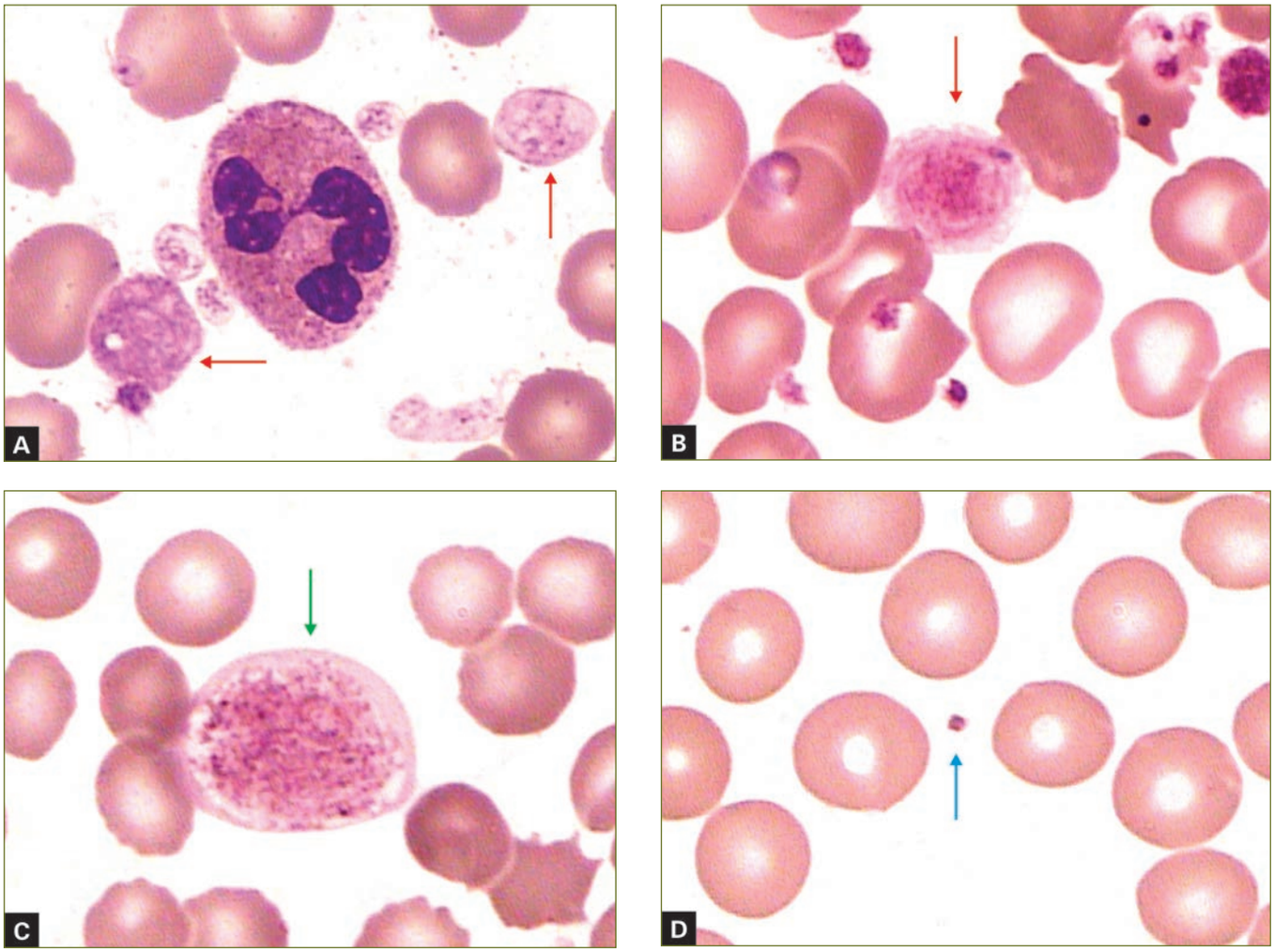


Figura 5.4 (**A** a **D**) Anormalidades no tamanho das plaquetas: macroplaquetas (*seta vermelha*), plaqueta gigante (*seta verde*) e plaquetas com tamanho reduzido (*seta azul*) (2.000×)

coagulação intravascular disseminada (CIVD), púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), hiperesplenismo, leucemias e plaquetopenias hereditárias.

A pseudoplaquetopenia é a formação de agregados plaquetários por mecanismos imunológicos associados ao ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Figura 5.8) ou desconhecidos. É importante investigar por meio da coleta da amostra em tubo com citrato de sódio (tubo de coagulograma).

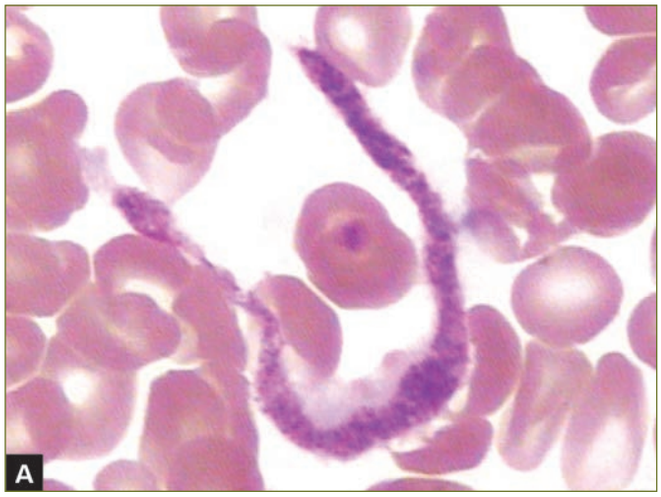
DOENÇAS HEREDITÁRIAS DA FUNÇÃO DAS PLAQUETAS

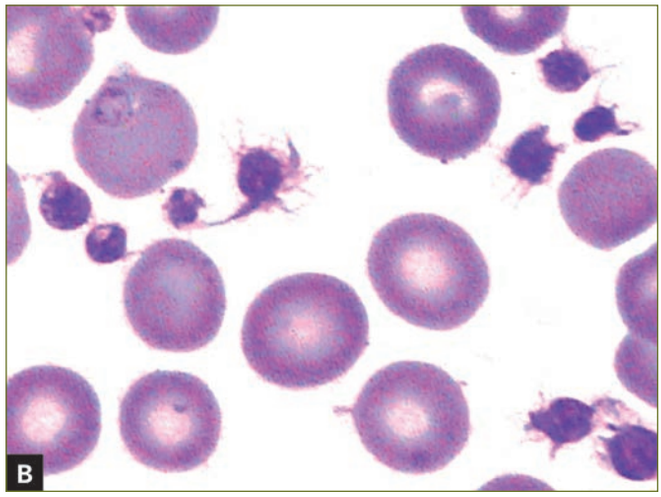
TROMBOASTENIA DE GLASMAN

A tromboastenia de Glasman (Figura 5.9) é uma doença hereditária autossômica recessiva que provoca um tipo de púrpura com contagem de plaquetas normais, ausência de retração do coágulo e tempo de sangramento prolongado. Ela é provocada pela deficiência de glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), um receptor de superfície das plaquetas produzidas nos megacariócitos, causada por mutações nos genes codificadores GPIIb ou GPIIIa. Assim, estes resultam em anormalidades qualitativas ou quantitativas nas proteínas de membrana plaquetárias. Nos pacientes com esta doença hereditária, a contagem de plaquetas está dentro da normalidade. Do mesmo modo, estão normais o tamanho, a forma e a meia-vida das plaquetas, assim como a adesão plaquetária, a liberação do conteúdo dos grânulos e as funções de sinalização. O defeito ocorre apenas na agregação das plaquetas. A maioria das crianças apresenta sintomas antes dos 5 anos de idade.

SÍNDROME DE BERNARD-SOULIER

A síndrome de Bernard-Soulier é caracterizada por disfunção plaquetária, plaquetopenia e plaquetas "gigantes" no sangue periférico (macrotrombocitopenia) (Figura 5.10). O sangramento nos pacientes com essa síndrome é maior que a plaquetopenia existente, o qual se explica pelo defeito na hemostasia decorrente da ausência de glicoproteína (GP) Ib/IX/V no





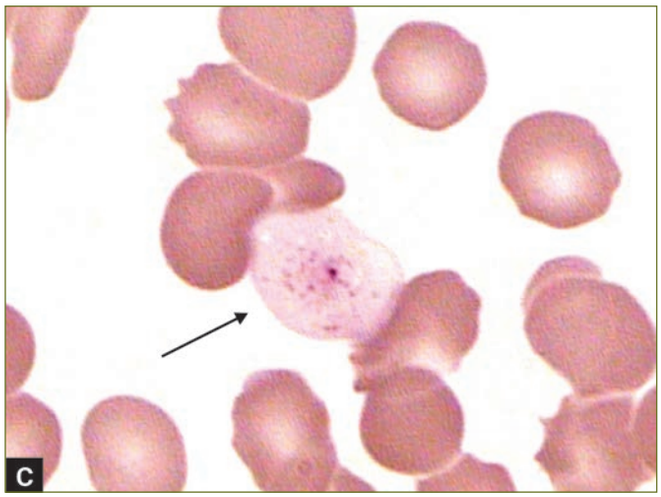
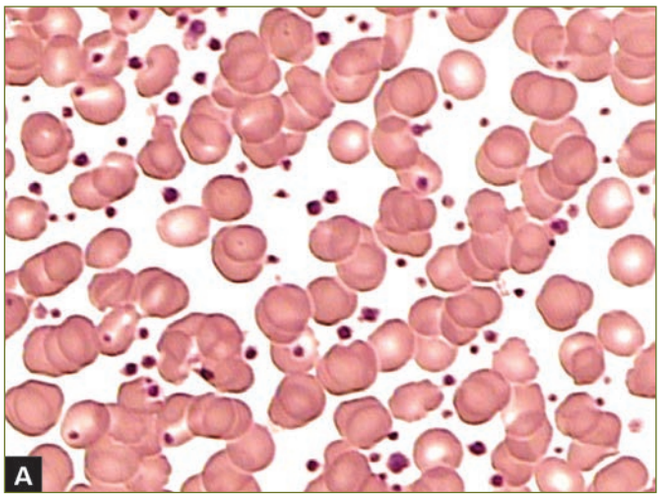


Figura 5.5 (**A** a **C**) Anormalidades na morfologia e na estrutura das plaquetas. Plaqueta bizarra (**A**); plaqueta com pseudópodos (**B**); e plaqueta sem estruturas (**C**) (*seta*) (2.000×)



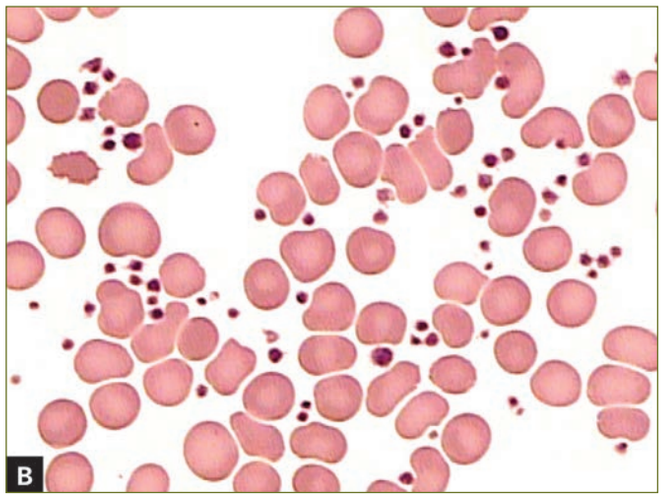


Figura 5.6 (**A** e **B**) Trombocitoses. Pacientes com contagens de plaquetas superiores a 1.000.000 células/mm^3 (2.000×)

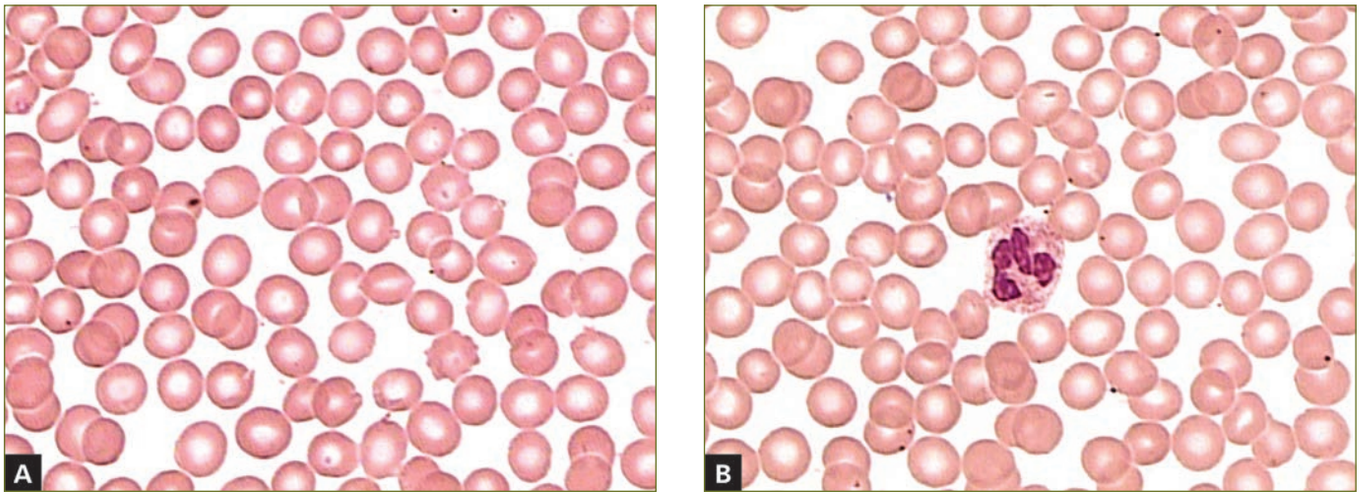


Figura 5.7 (**A** e **B**) Trombocitopenias. Pacientes com contagens de plaquetas abaixo de 10.000 células/mm^3 (2.000×)

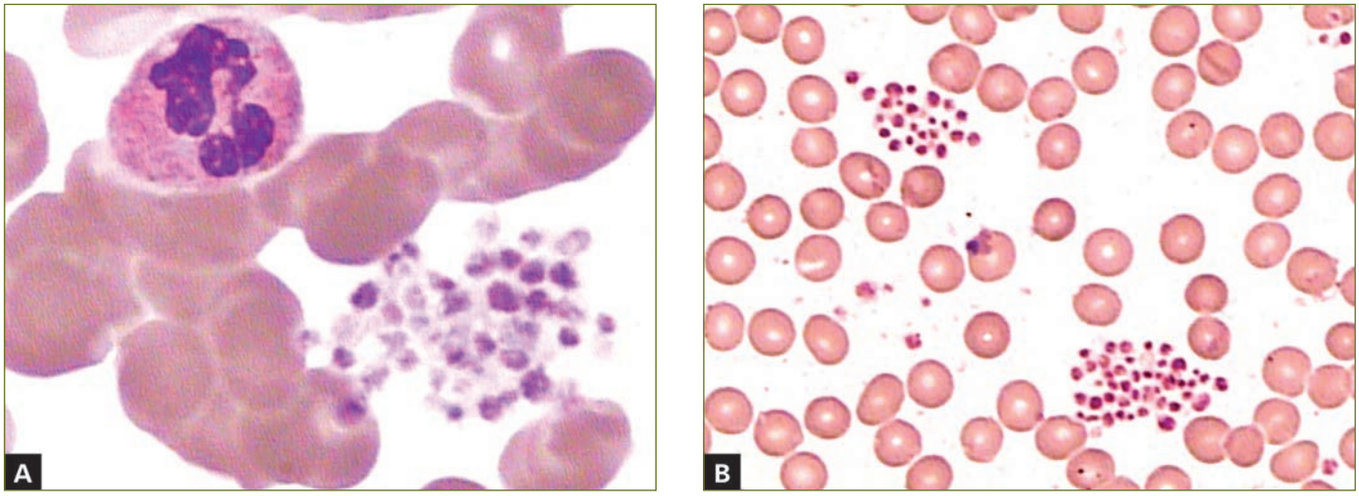


Figura 5.8 (**A** e **B**) Pseudoplaquetopenia EDTA dependente. Agregados de plaquetas típicos dessa pseudoplaquetopenia são observados no esfregaço do sangue periférico de pacientes portadores desta anormalidade *in vitro*. A coleta do sangue com o anticoagulante citrato de sódio ou a análise imediata do sangue realizando a coleta ao lado do contador hematológico automatizado são as medidas para corrigir esta alteração

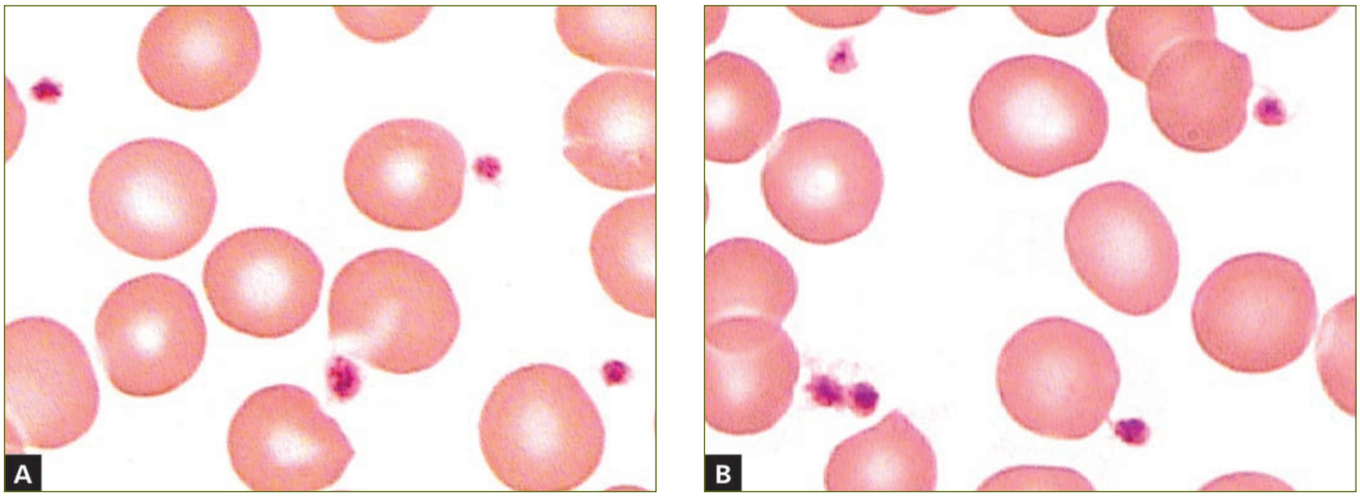


Figura 5.9 (**A** e **B**) Tromboastenia de Glasman: contagem de plaquetas, tamanho, forma e meia-vida dentro da normalidade. O defeito ocorre apenas na agregação das plaquetas (2.000×)

receptor de membrana plaquetária. A epistaxe é o sintoma mais comum, seguida por equimoses e hemorragia gengival. Os episódios de sangramento mais graves estão associados a cirurgia, extração dentária e acidentes. As hemorragias fatais são raras e a meia-vida plaquetária é menor que o normal. Nos pacientes homozigotos, o sangramento ocorre desde a infância precoce, mas a gravidade dos sintomas pode variar durante a puberdade e a vida adulta. O tamanho das plaquetas na síndrome de Bernard-Soulier é comparável aos observados nas síndromes MYH9. Os distúrbios plaquetários relacionados ao gene MYH9 também são um grupo de macrotrombocitopenias autossômicas dominantes.

SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH

É uma doença recessiva caracterizada pela redução do tamanho das plaquetas (Figura 5.11), por plaquetopenia, por infecções recorrentes, por eczema e pelo maior risco de doenças autoimunes. É causada por mutações no gene *WASP*, que desempenha papel fundamental no citoesqueleto de actina. A síndrome de Wiskott-Aldrich é uma imunodeficiencia primária ligada ao X, a qual já na infância apresenta manifestações hemorrágicas. Geralmente, a anemia autoimune e a vasculite cerebral são graves nessa doença. Na maioria das vezes, a contagem de plaquetas nesta síndrome está inferior a 70.000 células/mm^3.

SÍNDROME DAS PLAQUETAS CINZENTAS

A síndrome das plaquetas cinzentas é um distúrbio da homeostasia primária caracterizada por trombocitopenia e diminuição ou ausência de grânulos α das plaquetas (Figura 5.12). Também denominada síndrome da plaqueta α, esse distúrbio desenvolve tendência a sangramentos, petéquias e equimoses, devido à falta de grânulos α nas plaquetas. No esfregaço do sangue periférico além da trombocitopenia, que varia entre 20.000 e 110.000 plaquetas/mm^3, que pode ser atribuída à redução da meia-vida das plaquetas e ao sequestro esplênico, também se observa a alteração no tamanho das plaquetas (macrotrombocitopenia), com predomínio de macroplaquetas

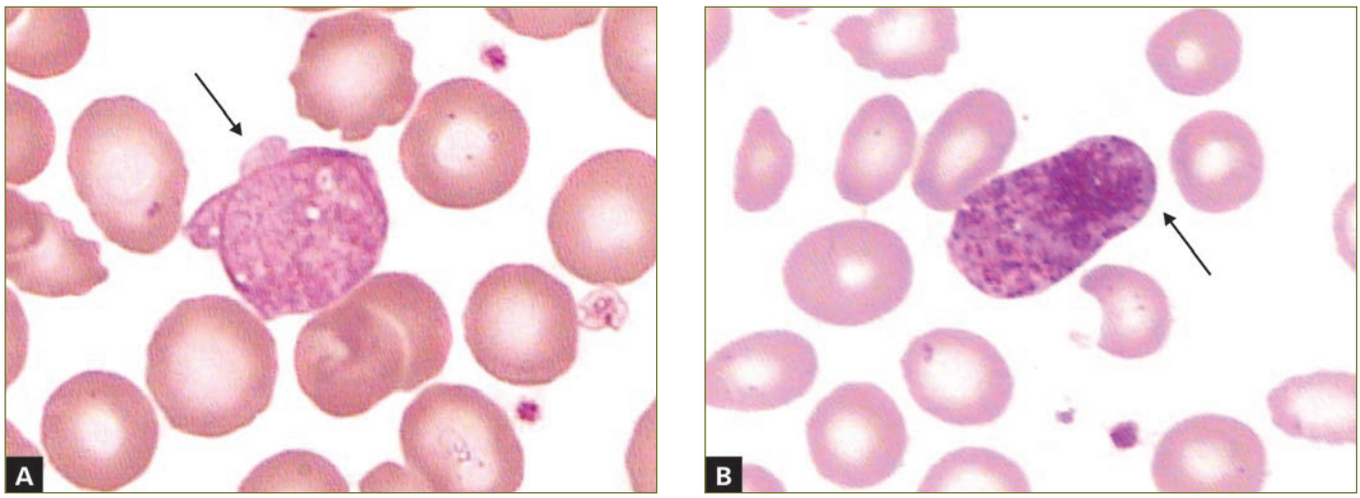


Figura 5.10 (**A** e **B**) Síndrome de Bernard-Soulier: plaquetas gigantes (*setas*) (2.000×)

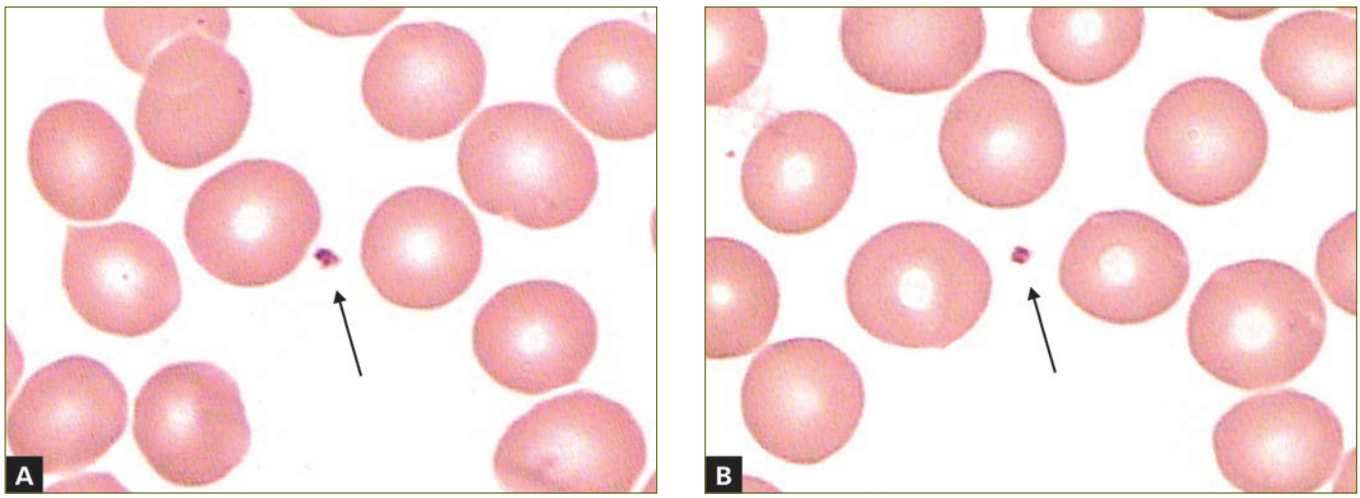


Figura 5.11 (**A** e **B**) Síndrome de Wiskott-Aldrich: redução do tamanho das plaquetas (*setas*) e plaquetopenia (2.000×)

agranulares de aspecto acinzentado na coloração de Wright-Giemsa, denominadas plaquetas cinzentas.

No paciente com a síndrome das plaquetas cinzentas, pode ser identificados no exame físico uma esplenomegalia e o tempo de sangramento geralmente prolongado, superior a 10min.

DISTÚRBIOS ADQUIRIDOS DAS PLAQUETAS

PÚRPURAS

São pequenos sangramentos subcutâneos (petéquias), de tamanho menor que 4mm, ou equimoses e hematomas quando maiores. Tais manifestações cutâneas não desaparecem na vitropressão, que é uma técnica de analisar o tipo da lesão apoiando uma lâmina de vidro sobre a pele e esvaziando os vasos de sangue. As púrpuras são classificadas em três tipos de acordo com a origem: vasculares, plaquetárias e trombóticas.

PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA IDIOPÁTICA

A púrpura trombocitopênica idiopática (PTI), ou púrpura trombocitopênica autoimune (Figura 5.13), é um distúrbio adquirido em que as plaquetas são destruídas por autoanticorpos, provocando uma evidente plaquetopenia. Geralmente, nas crianças, esta púrpura surge depois de uma infecção viral e desaparece sem qualquer tipo de tratamento em algumas semanas ou meses. Nos adultos, a PTI é tratada com altas doses de corticosteroides. Como o uso contínuo destes medicamentos produz diversos efeitos colaterais, a dose é interrompida logo que seja possível. Nesse distúrbio, mesmo a medula óssea aumentando a produção de plaquetas, não compensa a destruição. Os sintomas da plaquetopenia podem aparecer de maneira súbita na variante aguda ou de maneira mais insidiosa na forma crônica. No esfregaço do sangue periférico do paciente com PTI, observa-se plaquetopenia com plaquetas de tamanho aumentado. Em geral, as outras linhagens celulares permanecem inalteradas.

PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA TROMBÓTICA

A púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (Figura 5.14) pode promover manifestações hemorrágicas graves, devido à formação de microtrombos em todo o organismo. Provoca diminuição das plaquetas e dos glóbulos vermelhos, febre e lesões disseminadas em vários órgãos e, em casos muito graves, pode haver hemorragias internas espontâneas. Se não for

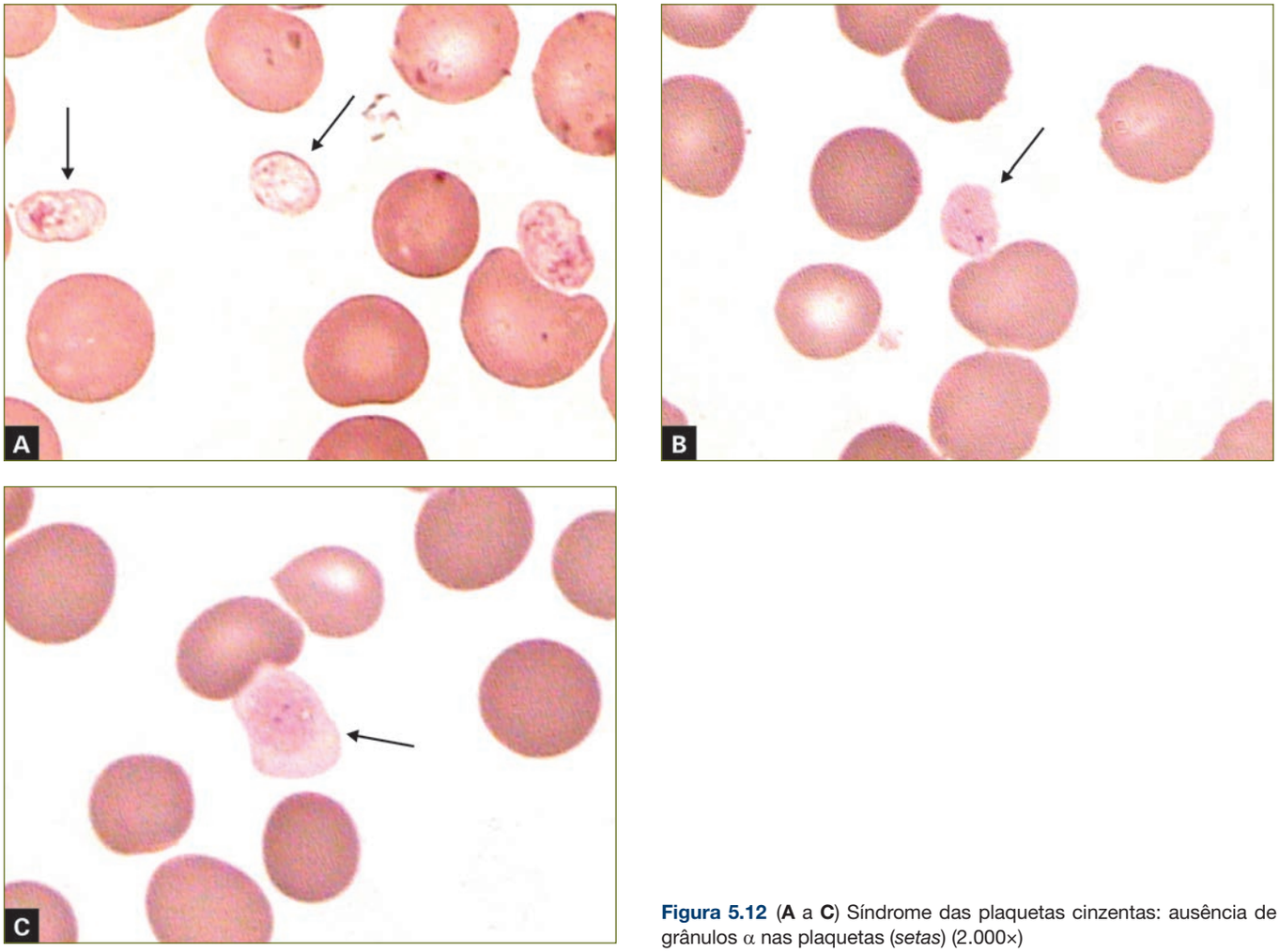


Figura 5.12 (**A** a **C**) Síndrome das plaquetas cinzentas: ausência de grânulos α nas plaquetas (*setas*) (2.000×)

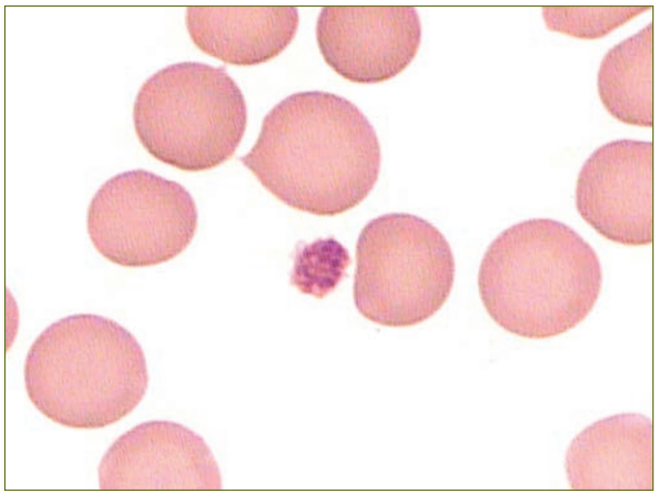


Figura 5.13 Púrpura trombocitopênica ideopática: plaquetopenia com plaquetas de tamanho aumentado (2.000×)

tratada, esta púrpura é geralmente fatal – mais da metade dos pacientes sobrevive com tratamento que se baseia na plasmaférese repetida ou nas transfusões de grandes quantidades de plasma. A PTT é um distúrbio adquirido das plaquetas de causa não conhecida. No esfregaço do sangue periférico, observam-se plaquetopenia e sinais de anemia hemolítica microangiopática com esquizócitos em "capacete" e fragmentos de hemácias, que surgem devido ao atrito com as microfibrinas aderidas às paredes dos capilares.

COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA

A coagulação intravascular disseminada (CIVD) promove uma ativação descontrolada da cascata de coagulação provocando um consumo excessivo dos fatores da coagulação e plaquetas. Isso forma fibrinas nos capilares, podendo levar à oclusão vascular e ao comprometimento do fluxo sanguíneo, além de alterações graves como falência de órgãos. Geralmente, a fibrinólise está inativada durante a fase de maior ativação da coagulação nos pacientes com CIVD. Entretanto, em casos de pacientes com leucemia mieloide aguda promielocítica (LMA) M3, a CIVD apresenta acelerada fibrinólise, o que favorece o quadro de sangramento grave. Esta síndrome adquirida percorre com hipofibrinogemia relacionada ao consumo de fibrinogênio pela coagulação.

DISTÚRBIOS HEMORRÁGICOS HEREDITÁRIOS

DOENÇA DE VON WILLEBRAND

O fator de von Willebrand é uma proteína sintetizada nas células endoteliais e nos megacariócitos e armazenado nos corpúsculos de Weibel-Palade nos grânulos alfaplaquetários. Sua função principal é mediar a adesão plaquetária em sítios de lesão tecidual e formar um complexo com o fator VIII, protegendo-o contra degradação e inativação. A doença de von Willebrand é provocada pela ausência ou pela deficiência do fator de von Willebrand e consta como a coagulopatia hereditária mais frequente em todo o mundo. Nesse tipo de distúrbio, o sangramento mais frequente é a epistaxe. Seguem-se as petéquias, as equimoses, a hemorragia profusa em cavidade oral, a menstruação excessiva nas mulheres e o sangramento intestinal. A sintomatologia inespecífica da doença e a interpretação dos resultados dos testes laboratoriais são as grandes dificuldades do diagnóstico. É necessária a dosagem do fator VIII plasmático da coagulação, do fator de von Willebrand e do cofator da ristocetina. Geralmente, a contagem de plaquetas está normal, mas o tempo de sangramento é muito prolongado.

HEMOFILIA

Existem dois tipos de hemofilia, a conhecida como hemofilia A, com deficiência relacionada ao fator VIII, e a hemofilia B, com deficiência do fator IX. A hemofilia A corresponde a 80% a 85% dos casos. Na hemofilia B, a maioria dos pacientes cursa com antecedentes familiares. Enquanto isso, na hemofilia A, até 40% dos pacientes não apresentam história

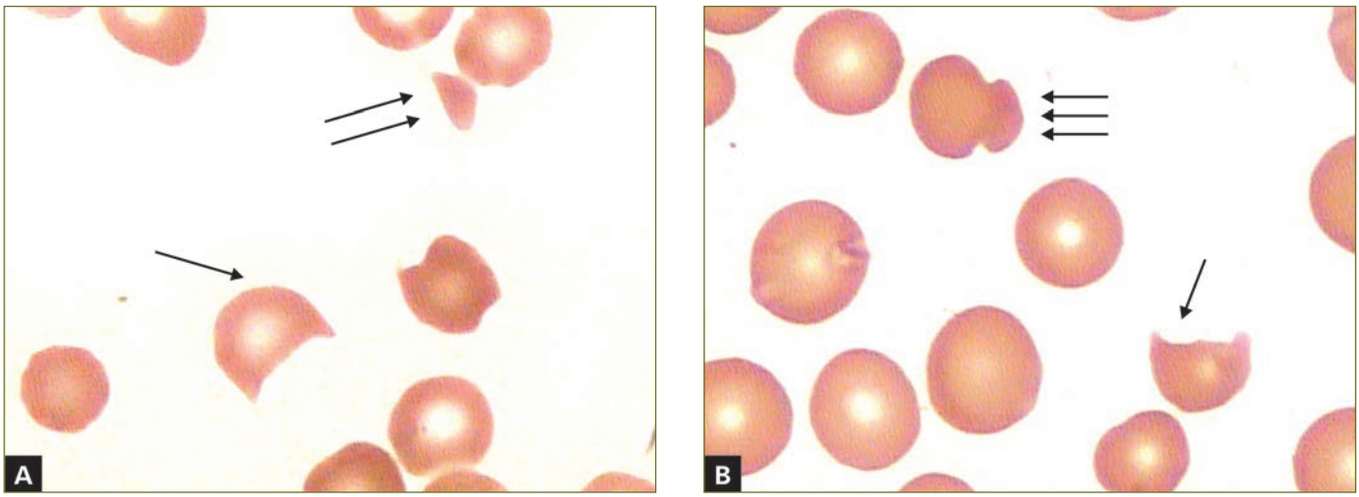


Figura 5.14 (**A** e **B**) Púrpura trombocitopênica trombótica. Plaquetopenia e anemia hemolítica microangiopática com esquizócitos em "capacete" (*uma seta*), fragmentos de hemácias (*duas setas*) e hemácias pinçadas (*três setas*) (2.000×)

familiar caracterizando a formação de novas mutações. São doenças basicamente hereditárias, de padrão recessivo ligado ao cromossomo X. As hemofilias A e B são clinicamente idênticas e caracterizam-se pelo aparecimento de sangramentos que ocorrem, sobretudo, após traumatismos. A gravidade do quadro hemorrágico e a frequência dos episódios de sangramento são, em geral, proporcionais à intensidade da deficiência do fator VIII ou IX. Os sangramentos mais comuns na hemofilia A e B são as hemartroses e os sangramentos musculares, embora a hematúria seja descrita em dois terços dos hemofílicos. Contudo, o sangramento no sistema nervoso central é a manifestação hemorrágica mais temida na hemofilia.

Nos exames laboratoriais, o hemograma pode apresentar apenas alterações sugestivas de anemia, decorrente de sangramentos crônicos, ou ser normal. Geralmente, a contagem de plaquetas apresenta-se normal, mas pode estar aumentada em alguns casos. No coagulograma, o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) é prolongado, mas o tempo de protrombina (TP) e o tempo de trombina (TT) são normais. Realiza-se o diagnóstico definitivo com dosagens dos fatores VIII e IX.

SATELITISMO PLAQUETÁRIO

O satelitismo plaquetário (Figura 5.15) é induzido por um fator plasmático, geralmente as imunoglobulinas G ou M (IgG e IgM) ocorrendo apenas *in vitro* na presença do anticoagulante EDTA. O fenômeno de adesão é mais ativo à temperatura abaixo de 25 graus e ocorre com mais frequência em pacientes com doenças autoimunes, hepáticas e neoplasias, principalmente na leucemia linfoide crônica. No esfregaço periférico, são observados neutrófilos circundados por plaquetas "rosetas", os quais também podem se apresentar unidos por uma camada de plaquetas. O satelitismo plaquetário não tem significado clínico, mas pode provocar pseudoplaquetopenia.

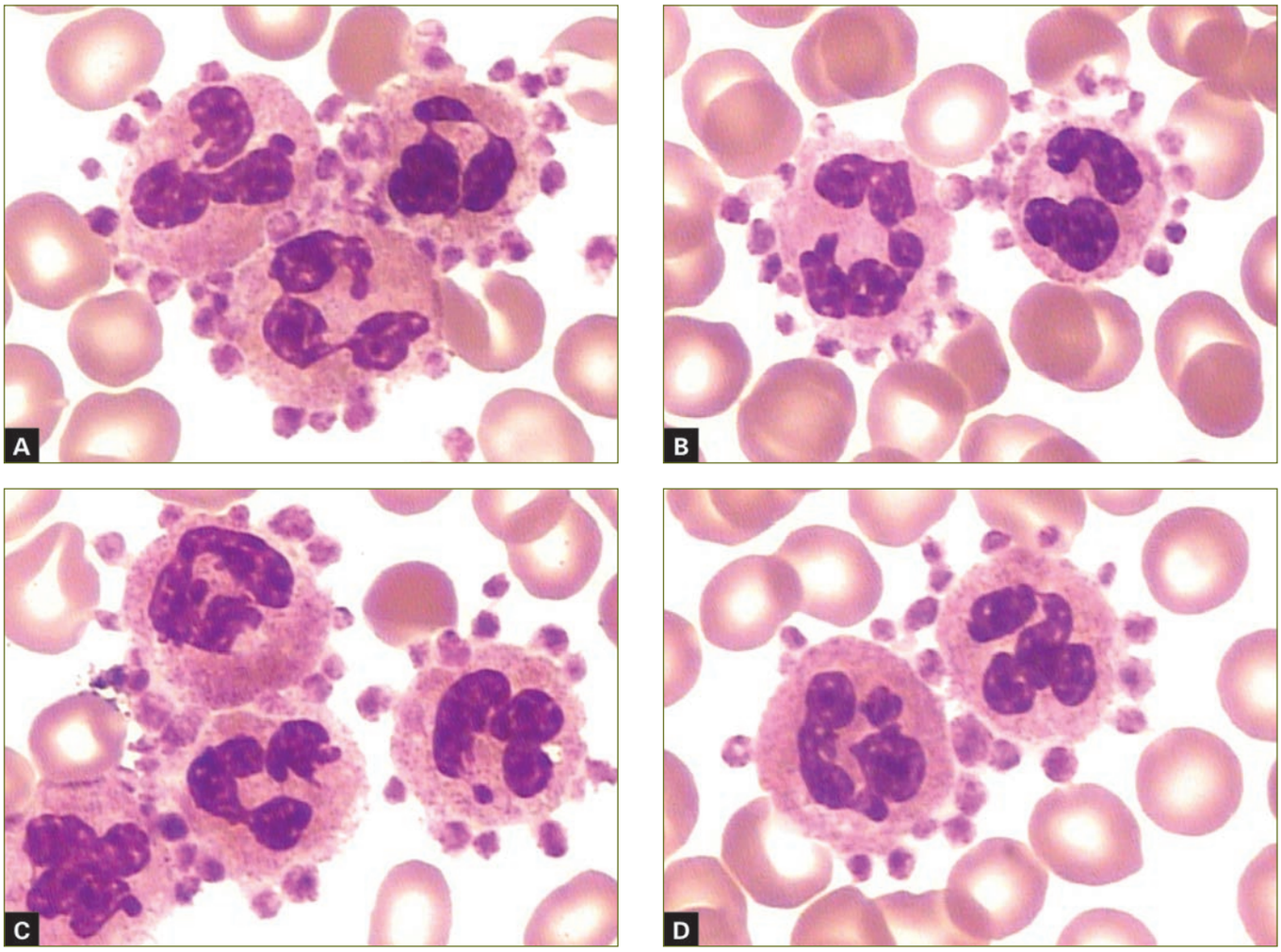


Figura 5.15 (**A** a **D**) Satelitismo plaquetário: neutrófilos circundados por plaquetas (rosetas) e unidos por uma camada de plaquetas (2.000×)

6

Líquidos Biológicos no Laboratório de Hematologia

INTRODUÇÃO

Geralmente, os exames hematológicos realizados nos líquidos biológicos têm importância fundamental no diagnóstico das enfermidades que os acometem. É necessário conhecer as alterações morfológicas e quantitativas que ocorrem nas células sanguíneas nos líquidos biológicos para um resultado correto. Outras estruturas e células de origem não sanguíneas presentes nos líquidos biológicos são estudadas neste capítulo com o objetivo de diferenciá-las de células sanguíneas e macrófagos.

LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

DEFINIÇÃO

O líquido cefalorraquidiano (LCR), também conhecido como líquido cerebroespinal ou liquor, é um fluido biológico intracraniano produzido pelo processo combinado de secreção ativa e ultrafiltração do plasma pelo plexo coroide, pelo espaço perivascular do encéfalo, pelos vasos sanguíneos da pia-máter e pelas células ependimárias. É um fluido que preenche o espaço subaracnóideo e ventricular, sendo composto em condições normais por pequenas concentrações de glicose, proteína, lactato, enzimas, potássio, magnésio e cloreto de sódio, os quais apresentam um pH alcalino entre 7,5 e 8,0.

O volume total do liquor é de, aproximadamente, 140 a 170mL no adulto e de 10 a 60mL no recém-nascido. A circulação deste fluido ocorre primeiramente em direção à medula e depois sobe para o encéfalo. São produzidos 500mL de liquor por dia e, para que não ocorra acúmulo desse fluido no encéfalo, as granulações de Pacchioni (também denominada vilosidades aracnoides) absorvem o excesso de liquor.

A função de proteção mecânica promovida pelo liquor protege e acolchoa o encéfalo amortecendo-o contra choques que poderiam causar lesões cerebrais. Além dessa primeira função, o liquor também desempenha outras funções, como: transporte de nutrientes, excreção e retiradas de subprodutos do metabolismo e manutenção da homeostase.

INDICAÇÕES DO EXAME DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Muitos fatores e processos conduzem o médico a solicitar o exame de LCR, mesmo sendo um procedimento invasivo. Este exame é muito utilizado para o diagnóstico, o tratamento e o estadiamento das alterações a seguir:

- Hemorragia intracraniana.
- Processos desmielinizantes.
- Processos infecciosos do sistema nervoso central.
- Processos infecciosos com foco não identificado.
- Processos granulomatosos com imagem inespecífica.
- Leucemias e linfomas.
- Imunodeficiências.

O EXAME DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

A análise do LCR foi introduzida como exame complementar para o diagnóstico de enfermidades neurológicas por Quincke em 1891. A partir daí, passou a ser utilizado vastamente, além de acompanhar e identificar o estágio de processos infecciosos, inflamatórios e neoplásicos. Seu procedimento completo envolve os exames físico, citológico, bioquímico, microbiológico e imunológico.

O exame de LCR é um teste analisado em vários setores do laboratório (hematologia, bioquímica, sorologia, imunologia e

microbiologia). O profissional do setor de hematologia é responsável pela contagem total e diferencial dos leucócitos e pela análise da série vermelha (contagem das hemácias e dosagem da hemoglobina), bem como pela pesquisa ou contagem de populações específicas de células.

Coleta

A coleta do liquor, mesmo feita por especialista experiente, pode não apresentar sucesso em sua realização. Isso porque alguns pacientes apresentam alterações como malformações da coluna vertebral, escolioses, lordoses extremas, malformações occipitovertebrais e osteófitos (também chamados de "bicos de papagaio", que são formações ósseas em gancho localizadas nos discos da coluna vertebral).

Como o procedimento diagnóstico é invasivo, o exame de LCR só pode ser realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente ou por seu representante legal, de acordo com a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), de 10 de outubro de 1996. Na maior parte das vezes, a punção é feita entre a 3ª e a 4ª ou entre a 4ª e a 5ª vértebras lombares, das quais se coleta o material em três tubos:

- **Tubo 1 – bioquímica e sorologia**: frasco estéril, com ou sem anticoagulantes. Estabilidade: 7 dias a 2 e 8°C.
- **Tubo 2 – microbiologia**: frasco estéril, sem anticoagulantes ou hemocultura. Estabilidade: 3h à temperatura ambiente.
- **Tubo 3 – citologia**: frasco estéril, com anticoagulantes. Estabilidade: 2h à temperatura ambiente, ou 24h a 2 e 8°C.

Exame físico – exame macroscópico

No exame macroscópico do LCR, observam-se o aspecto e a cor do liquor (Figuras 6.1 a 6.4). No adulto normal, o liquor apresenta-se incolor e cristalino de aspecto "água de rocha",

Figura 6.1 LCR: amostra normal, límpida e transparente, de aspecto "água de rocha"

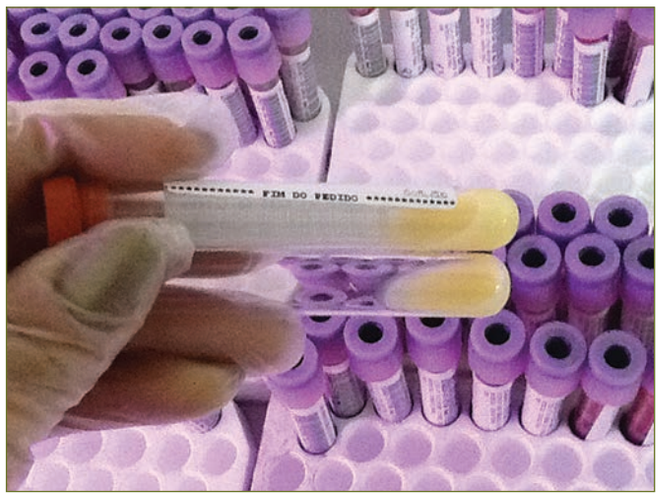


Figura 6.2 LCR: aspecto turvo, em decorrência de acúmulo de leucócitos. Observado em meningites

Figura 6.3 LCR: aspecto sanguinolento, devido à presença de hemácias. Observado em hemorragias ou em punção traumática

e xantocrômico no recém-nascido, devido à concentração elevada de bilirrubina. A Tabela 6.1 mostra a aparência, a causa e o significado clínico de cada alteração de aspecto e de cor do LCR.

Erro de punção ou acidente vascular encefálico hemorrágico

Quando a aparência do LCR for sanguinolenta, é importante a análise laboratorial da amostra para diferenciação entre o

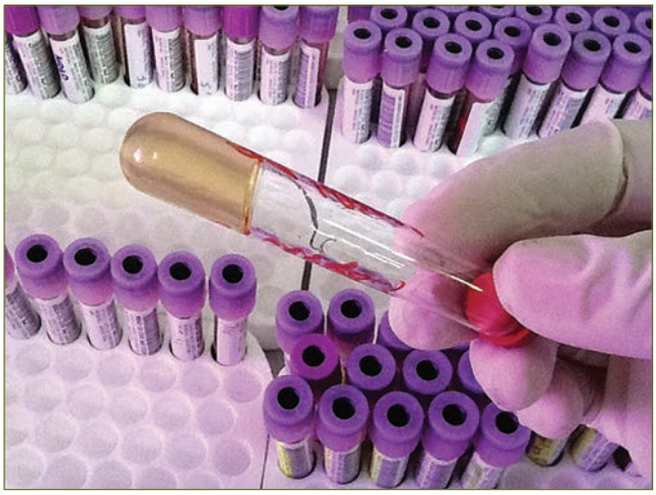


Figura 6.4 LCR: coágulo; fibrinogênio na amostra causado por punção traumática

Tabela 6.1 Aparência do LCR

Aparência	Causa
Cristalino	Normal
Sanguinolento	Hemácias
Xantocrômico	Bilirrubina, hemoglobina ou proteínas
Opaco, turvo ou leitoso	Leucócitos, proteínas
Oleoso	Resíduo de contraste
Coagulado	Fatores de coagulação, proteínas

acidente de punção e o acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH). Cabe ao laboratório utilizar o teste dos três tubos e a análise citológica do sedimento.

Teste dos três tubos

- **Sobrenadante xantocrômico**: as hemácias permanecem no LCR por 2h antes que comece a hemólise; assim, um sobrenadante xantocrômico seria resultado de sangue presente há mais tempo que uma hemorragia recente. O tubo deve ser centrifugado e o sobrenadante, examinado contra um fundo branco.
  - *Sobrenadante incolor*: sugere acidente de punção.
  - *Sobrenadante eritrocrômico ou xantocrômico*: sugere AVEH.
- **Distribuição desigual de hemácias**: o sangue oriundo de uma hemorragia intracraniana é distribuído uniformemente pelos três tubos. Se a diferença na contagem das hemácias for menor que 10% entre os tubos, sugere-se AVEH. Entretanto, se a diferença for maior que 10%, sugere-se acidente de punção.
- **Formação de coágulos**: no LCR coletado por punção traumática, pode ocorrer formação de coágulos devido à presença de fibrinogênio plasmático na amostra. Enquanto isso, no AVEH não há fibrinogênio para formar coágulos.

Análise citológica do LCR sanguinolento

No AVCH, a análise citológica apresenta geralmente eritrófagos e/ou macrófagos com cristais de hemossiderina ou hematoidina. Enquanto no erro de punção não se observam alterações citológicas nos leucócitos além da presença evidente de hemácias.

Exame citológico

Contagem global de células

Utiliza-se para a contagem global de leucócitos e hemácias a câmara de Fuchs-Rosenthal, a qual tem altura de 0,2mm, área total de 16,0mm² e volume total de 3,2 células/mm³. Ela é dividida em 16 quadrados, que, por sua vez, são subdivididos em 16 quadrados menores. A contagem automatizada realizada por contadores hematológicos por meio da metodologia de impedância, dispersão e radiofrequência é bastante utilizada pelos laboratórios de hematologia, devido à sua agilidade, precisão e reprodutibilidade nos resultados.

Valores de referência: (contagem de leucócitos e hemácias)

- **RN**: até 15 leucócitos/mm³
- **Adultos**: até 5 leucócitos/mm³
- **Hemácias**: zero

Quando o número global de leucócitos está aumentado, convém fazer a contagem diferencial da amostra por meio do estudo da lâmina preparada rapidamente após a coleta.

Centrifugação e preparo da lâmina

Utiliza-se a amostra total do LCR ou do sedimento obtido por centrifugação em baixa rotação para a confecção da lâmina. A amostra deve ser fresca, para não prejudicar o estudo da morfologia celular.

O LCR é um meio inapropriado para a manutenção da morfologia das células. Por isso, a preparação da lâmina deve ser rápida, já que as células se deterioram rapidamente, em virtude do pH elevado e da baixa pressão osmótica que podem inchar e destruir algumas células.

Para preparar a lâmina, é utilizada a câmara de Suta (Figuras 6.5 e 6.6). Ela tem um sistema de filtros de papel que absorvem a parte líquida do LCR concentrando as células e fornecendo um esfregaço de boa qualidade para o exame microscópico. A contagem diferencial dos leucócitos é feita no esfregaço corado pelo corante May-Grunwald-Giemsa. Assim, realiza-se a contagem de 100 células classificando-as em termos de porcentagens.

Exame microscópico

No LCR normal, são encontrados principalmente linfócitos e monócitos. Nos adultos, observam-se o predomínio de linfócitos e a presença de alguns monócitos. Entretanto, os monócitos predominam em crianças. Os neutrófilos também podem ser observados raramente no LCR normal, mas é considerado anormal o número elevado dessas células, assim como a presença de plasmócitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, blastos, células linfoides e células tumorais.

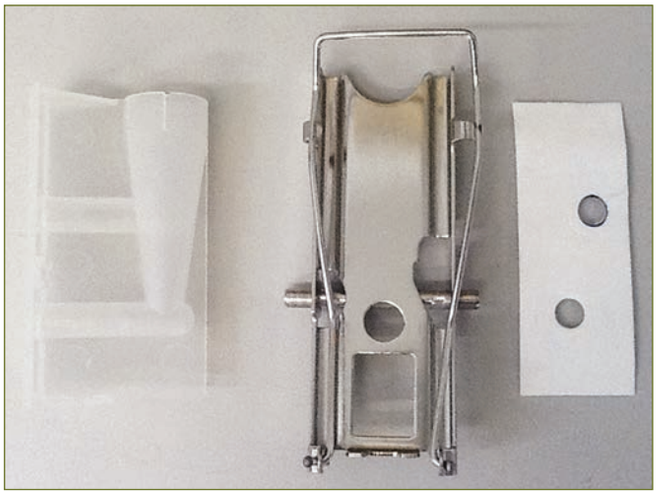


Figura 6.5 Equipamento citocontenedor para citocentrífuga utilizado no preparo da lâmina

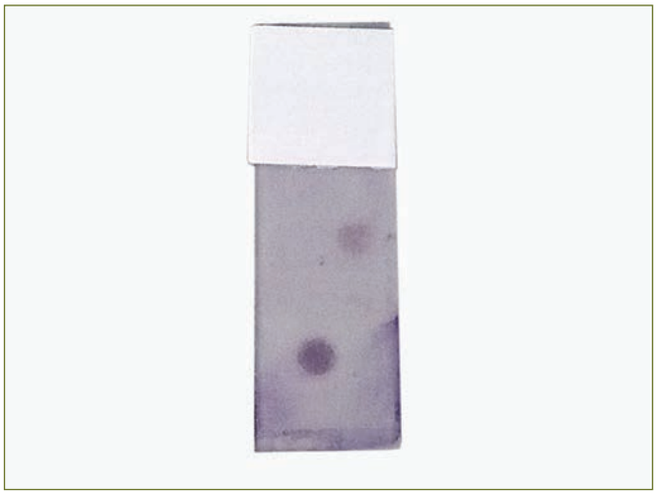


Figura 6.6 Lâmina com os dois pontos de concentração de células (*setas*)

Contagem diferencial e valores de referência:

- **Linfócitos**: >90%
- **Monócitos**: 3% e 8%
- **Neutrófilos**: 0% e 2%

Plasmócitos

As células plasmáticas em número aumentado ocorrem, principalmente, na esclerose múltipla e em condições associadas a reações linfocitárias.

Células ependimais

Geralmente, são observadas em aglomerados celulares, muitas vezes exibindo nucléolos. Provêm do revestimento dos ventrículos e do canal neural.

Blastos

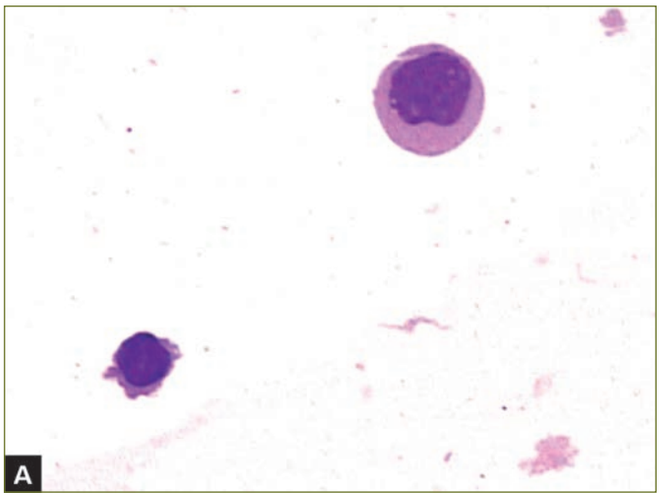
Os blastos encontrados no LCR estão associados a infiltração leucêmica nas meninges e surgem caracteristicamente após várias remissões por meio da quimioterapia. A leucemia linfoide aguda e a leucemia promielocítica aguda são as leucemias mais frequentes que apresentam expansão meningeana.

Citologia neoplásica

Critérios citológicos de malignidade

Blastos ou células linfoides são observados quando há comprometimento do SNC por leucemias e linfomas. No LCR, também podem ser encontradas células cancerosas provenientes da metástase de vários carcinomas.

Geralmente, as células cancerosas apresentam discariose, que é a quebra da relação núcleo/citoplasma. Podem



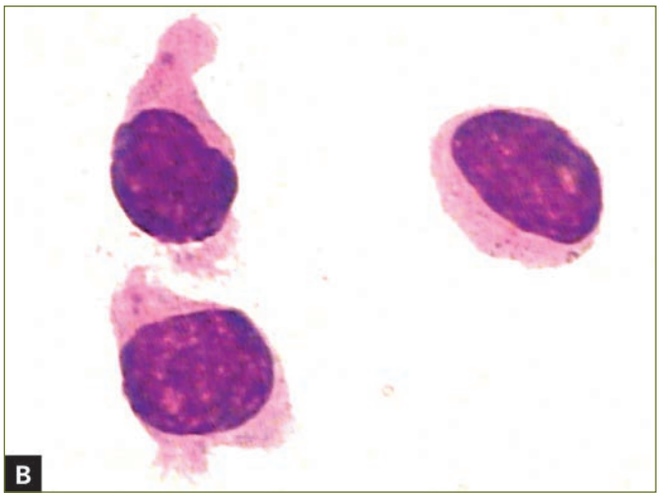
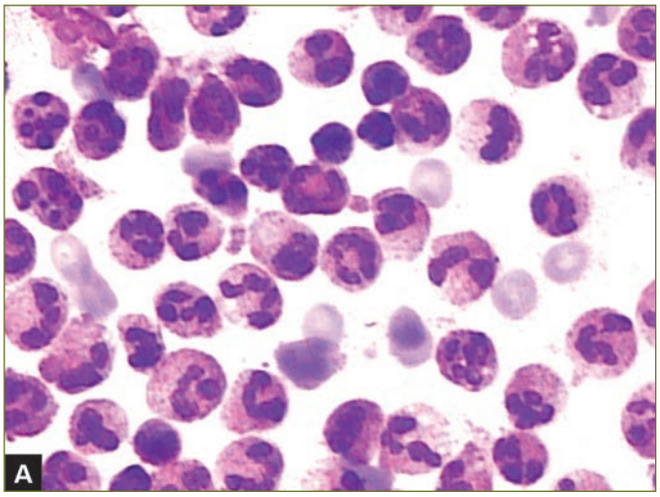
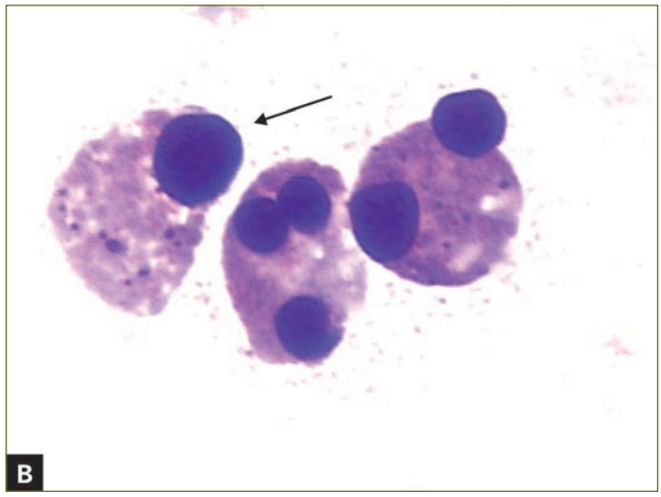


Figura 6.7 (**A** e **B**) LCR: citologia normal. Predomínio de linfócitos e raros monócitos (1.200×)





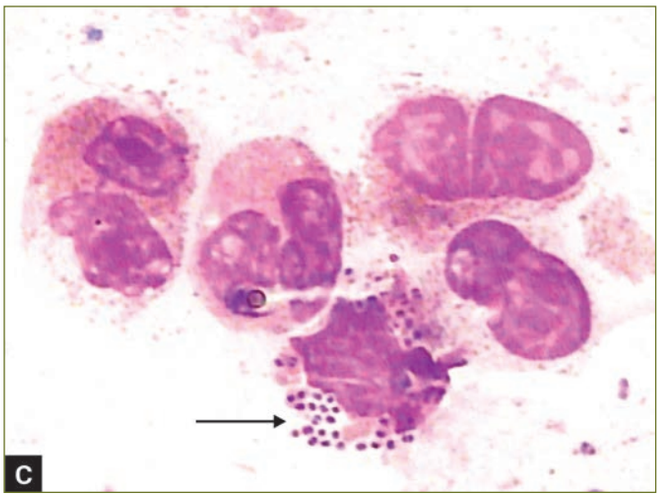
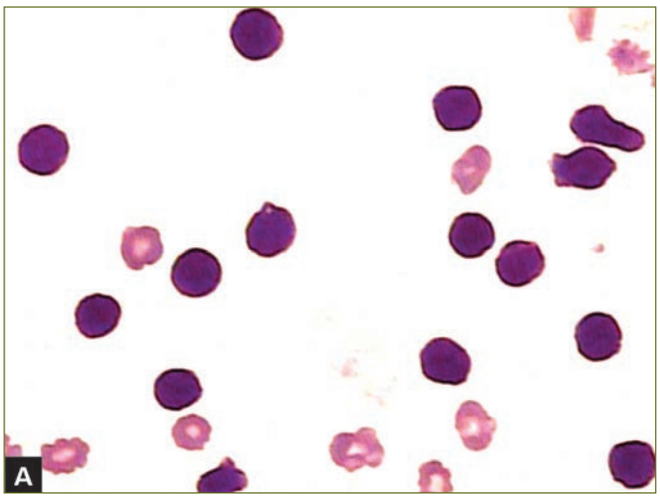


Figura 6.8 (**A** a **C**) Neutrófilos: o número de neutrófilos aumentado (**A**) sugere meningite bacteriana, fase inicial de meningite viral, tuberculosa e fúngica ou hemorragia cerebral. Em alguns casos, os neutrófilos apresentam-se com os núcleos de forma picnótica (*seta*) (**B**), o que demonstra o processo avançado de destruição celular, apresentando bactérias intracelulares (*seta*) (**C**) (2.000×)



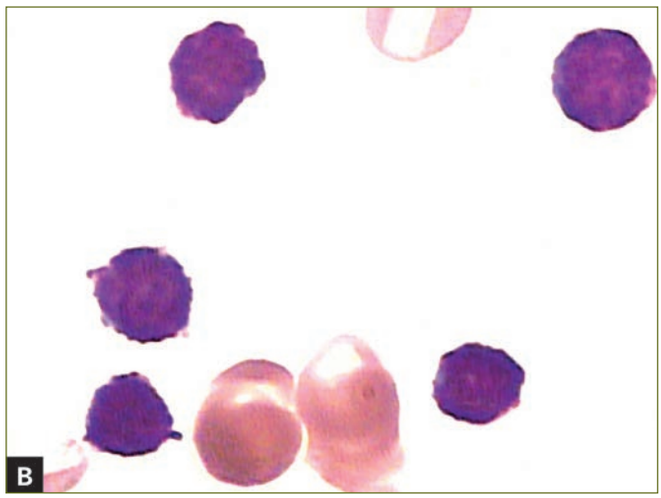


Figura 6.9 (**A** e **B**) Linfócitos. Os linfócitos no LCR podem tornar-se ativados, levando à formação de linfócitos atípicos e linfócitos plasmocitoides. O número de linfócito aumentados está relacionado com esclerose múltipla e meningites viral, tuberculosa e fúngica

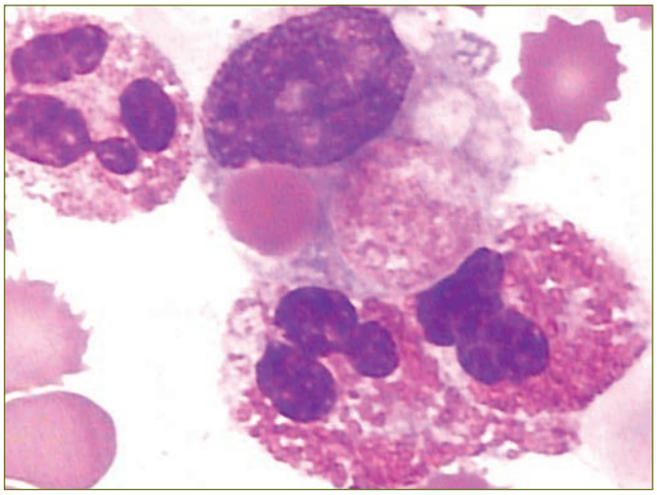
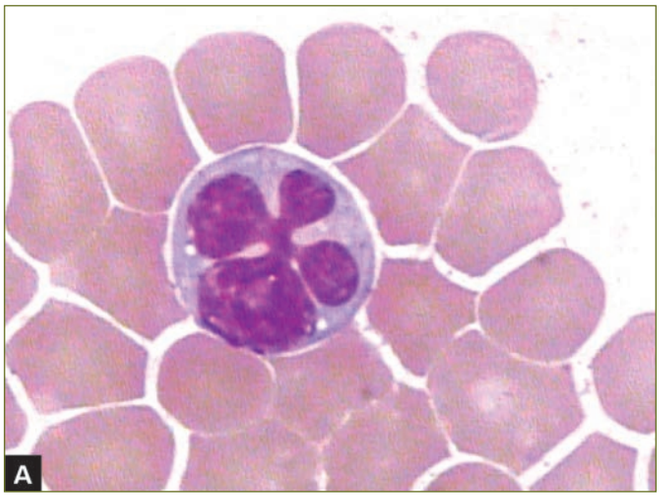


Figura 6.10 Eosinófilos. Pequenos aumentos na contagem dos eosinófilos no LCR, entre 1% a 5%, também têm significado clínico, embora o aumento clinicamente importante é aquele superior a 10%. Isso sugere infecções parasitárias ou reações alérgicas



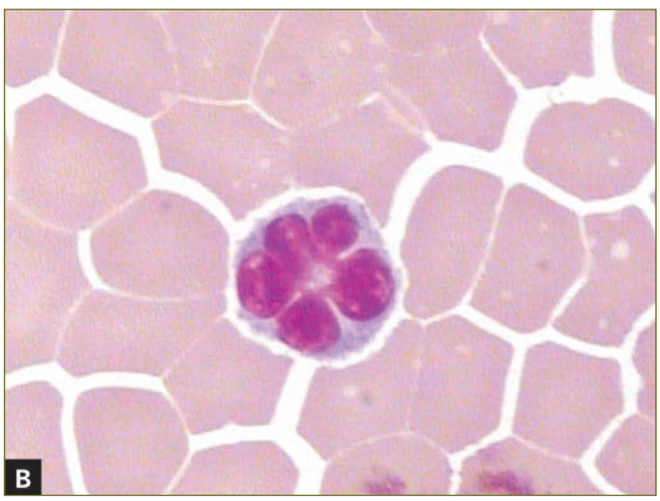
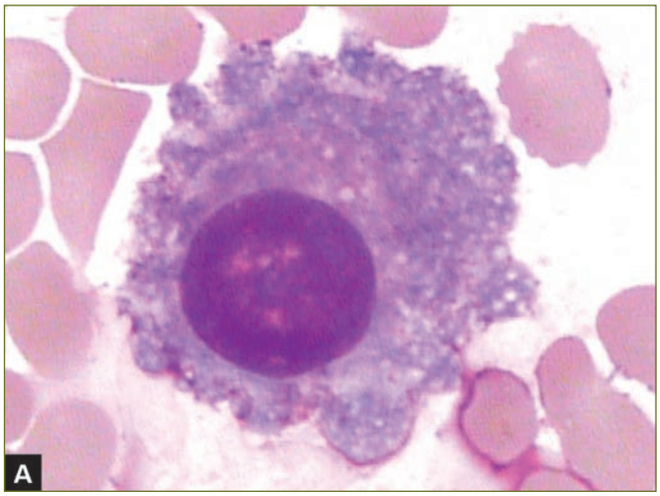
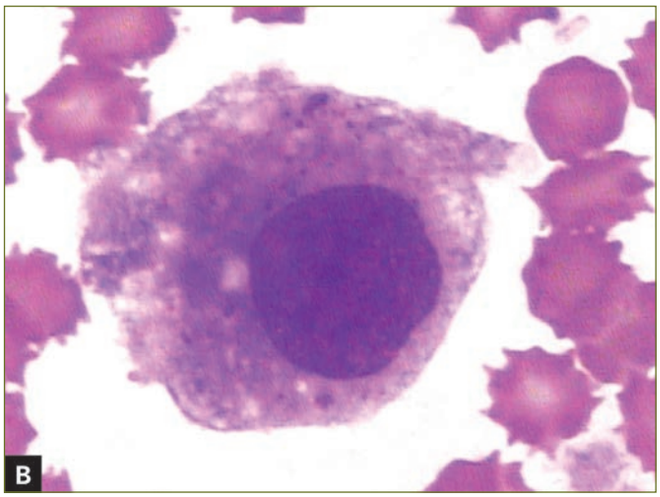


Figura 6.11 (**A** e **B**) Células linfoides malignas: em alguns linfomas não Hodgkin, pode ocorrer comprometimento do LCR, com o surgimento de células linfoides





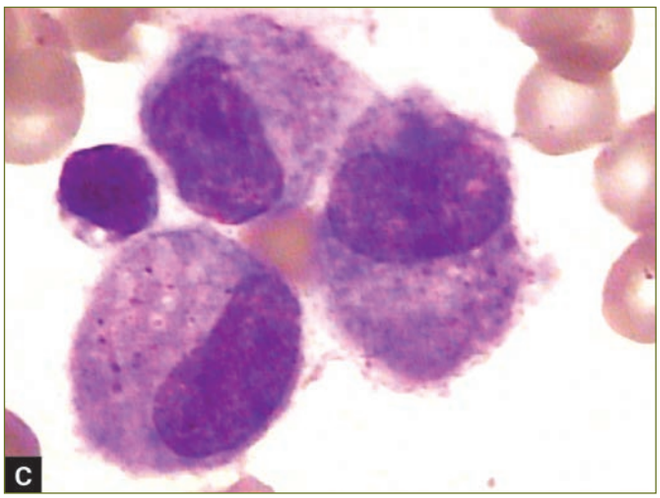


Figura 6.12 (**A** a **C**) Macrófagos. Os macrófagos do LCR apresentam-se de tamanho variável alcançando até 50μ de diâmetro. O núcleo é excêntrico e o citoplasma, abundante e mal delimitado, geralmente com elementos fagocitados. O número aumentado de macrófagos sugere meningite crônica, meningite bacteriana tratada, injeções intratecais e hemorragia subaracnóidea

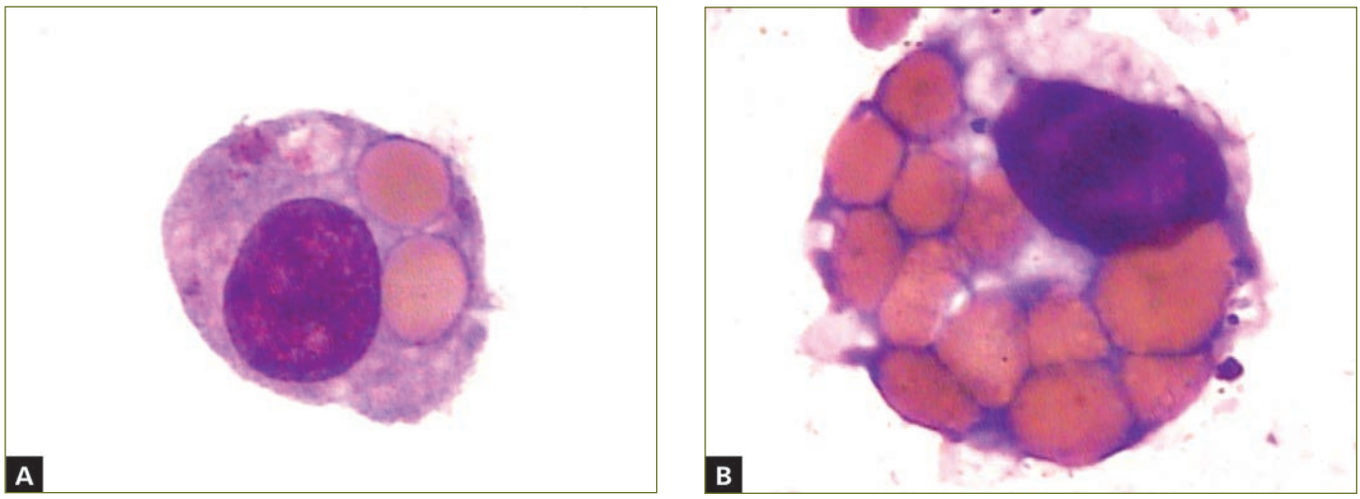


Figura 6.13 (**A** e **B**) Macrófago eritrófago. Surge na fase inicial da hemorragia subaracnóidea, entre 12 e 24h após o primeiro sangramento, permanecendo até 1 semana. Os eritrófagos são macrófagos que têm em seu citoplasma hemácias de cor normal, apresentando modificação cromática e de estrutura ao passar dos dias

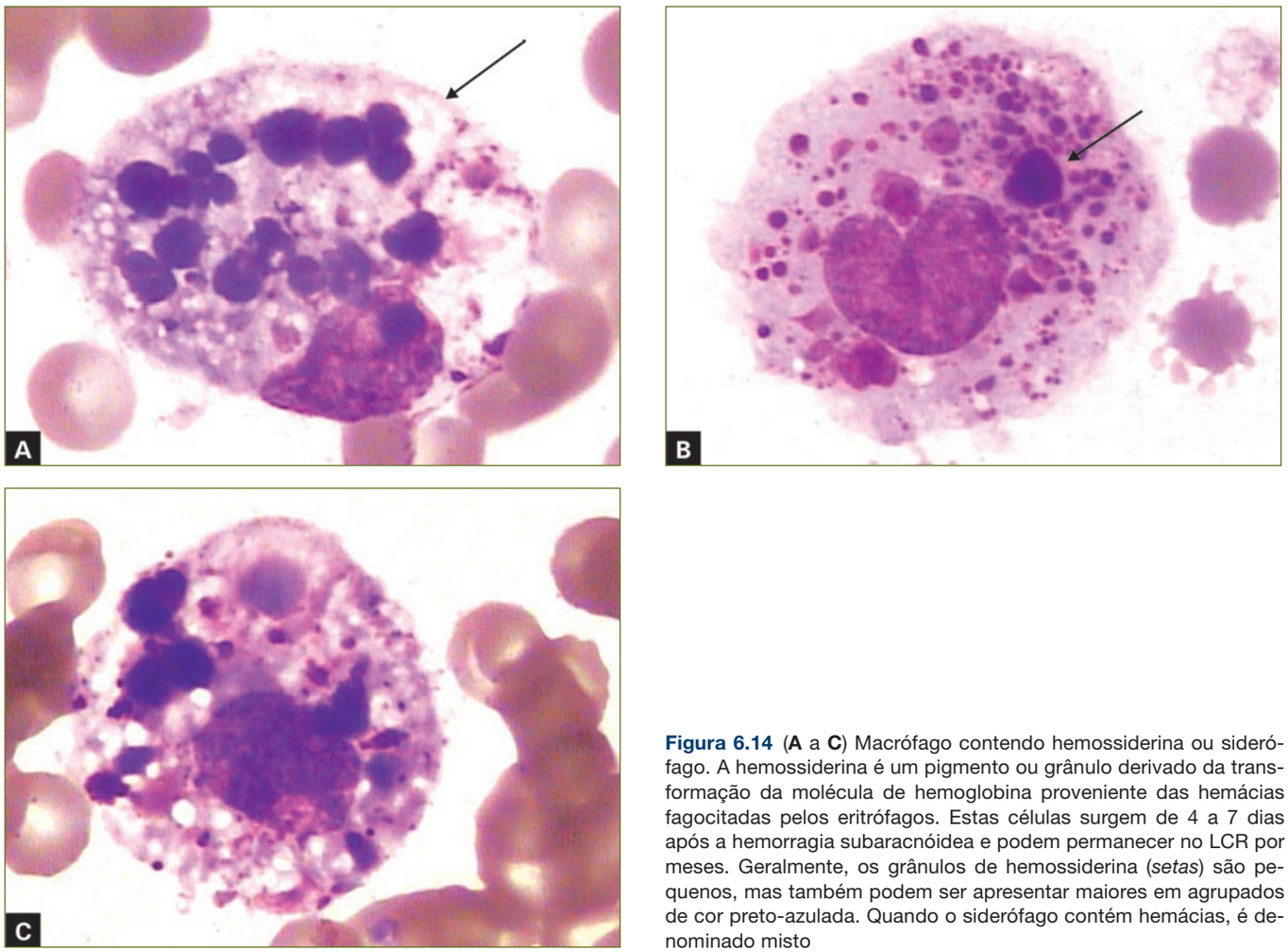


Figura 6.14 (**A** a **C**) Macrófago contendo hemossiderina ou siderófago. A hemossiderina é um pigmento ou grânulo derivado da transformação da molécula de hemoglobina proveniente das hemácias fagocitadas pelos eritrófagos. Estas células surgem de 4 a 7 dias após a hemorragia subaracnóidea e podem permanecer no LCR por meses. Geralmente, os grânulos de hemossiderina (*setas*) são pequenos, mas também podem ser apresentar maiores em agrupados de cor preto-azulada. Quando o siderófago contém hemácias, é denominado misto

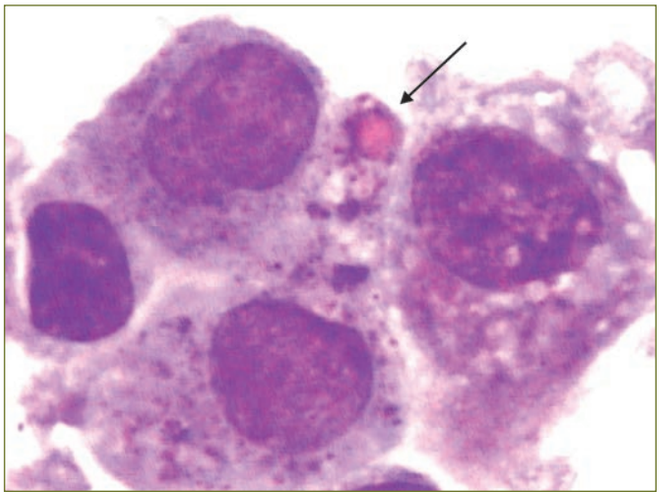
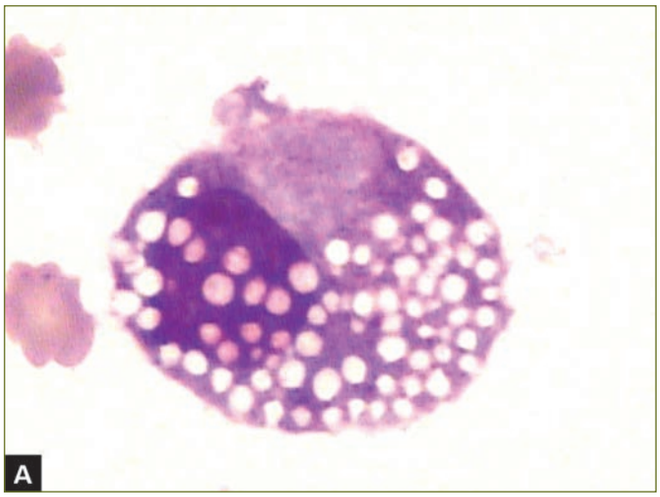


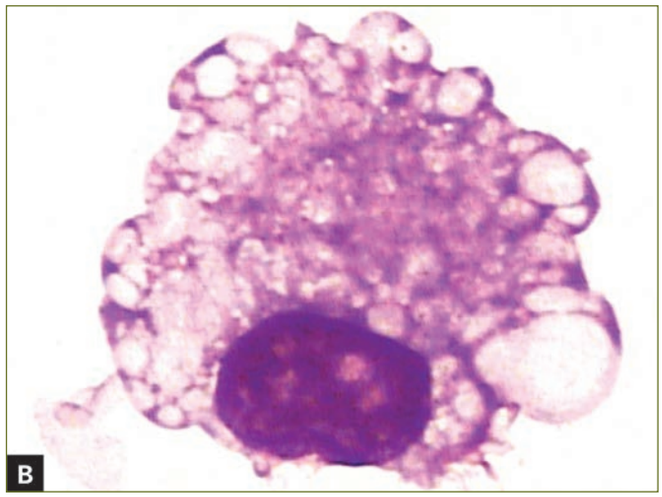
Figura 6.15 Macrófago contendo cristal de hematoidina. O cristal de hematoidina (*seta*) é derivado dos grânulos de hemossiderina e surgem no citoplasma aproximadamente 15 dias após a primeira hemorragia subaracnóidea, permanecendo por meses. Os cristais são observados em cor amarelo-amarronzada

apresentar núcleos grandes e hipercromáticos com nucléolos evidentes, tamanhos e formatos celulares variados e agrupamentos celulares promovidos pela fusão das membranas.

Líquidos cavitários, pleurais, peritoneais/ascíticos e pericárdicos

Os l**íquido**s cavitários, ou fluidos serosos, estão situados entre duas membranas que revestem as cavidades fechadas do corpo (pleural, pericárdica e peritoneal). Uma das membranas reveste as paredes da cavidade (parietal) e a outra cobre os órgãos do interior da cavidade (membrana visceral). A principal função dos líquidos cavitários é a lubrificação entre as membranas, evitando atritos causados pela movimentação dos órgãos fechados. A produção e a reabsorção dos líquidos cavitários ocorrem constantemente sem interrupção, sendo estes formados por meio de ultrafiltrados de plasma. Alterações na pressão hidrostática e coloidosmótica (oncótica) dos capilares de ambos os lados da membrana provocam aumento do líquido cavitário, levando ao chamado "derrame". O derrame causa desconforto, compressão e dor, prejudicando o funcionamento dos órgãos adjacentes e pode se agravar caso haja uma infecção. A aspiração ou o esvaziamento são utilizados como





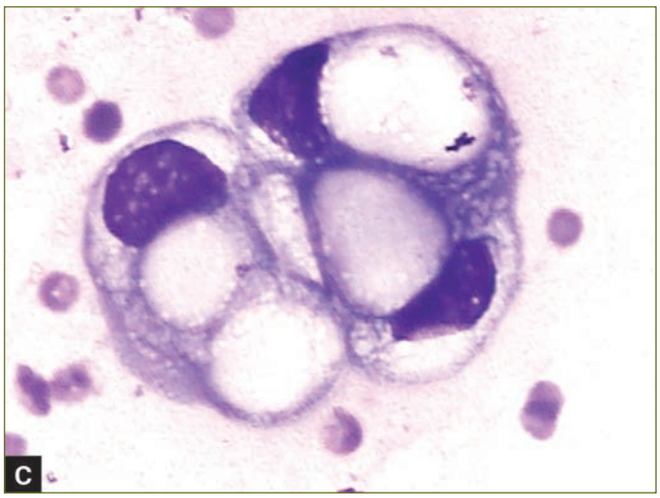


Figura 6.16 (**A** a **C**) Macrófago vacuolizado. Esta célula apresenta uma variação nos números de vacúolos em seu citoplasma, podendo exibir um ou poucos vacúolos grandes, ou pequenos e numerosos. Geralmente, são compostos por resíduos celulares, material carbonáceo ou lipídio. Costumam ser encontrados em processos infecciosos

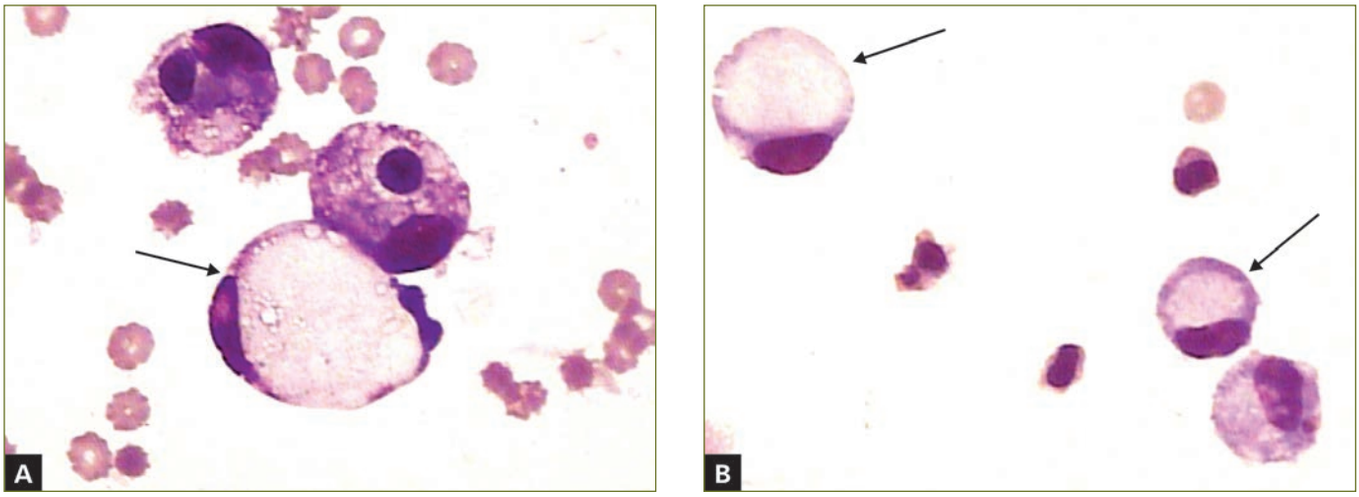


Figura 6.17 (**A** e **B**) Macrófago em anel de sinete. A morfologia celular do macrófago em anel de sinete (*setas*) assemelha-se à "célula em anel de sinete", de origem maligna. Enquanto isso, o macrófago em anel de sinete origina-se da intensa fagocitose de lipídios, formando um grande vacúolo e empurrando o núcleo para a periferia

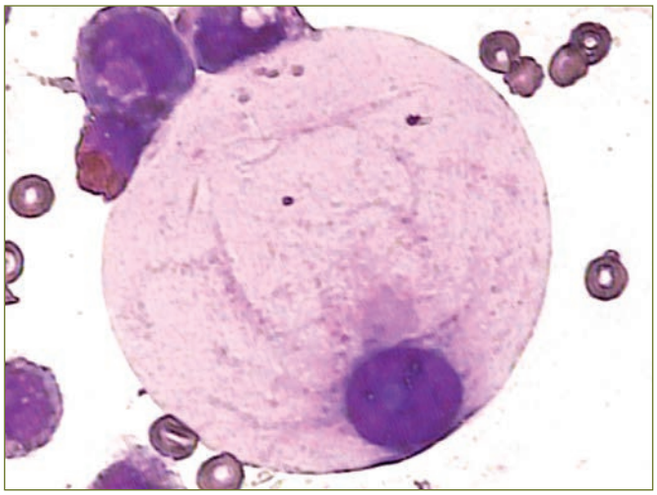


Figura 6.18 Macrófago lipófago. Esta célula surge no LCR a partir da fagocitose de gordura proveniente de danos no sistema nervoso central provocado por necrose cerebral, infarto ou traumatismo craniano

recurso terapêutico e também como diagnóstico etiológico. O líquido coletado pode ser utilizado para exames bioquímicos, citológicos, imunológicos e microbiológicos, entre outros. As membranas parietal e visceral contêm uma única camada de células mesoteliais ou denominadas mesoteliócitos. Estas células estão presentes frequentemente nos derrames por neoplasias, porém são comuns também nos transudatos.

Classificação dos derrames cavitários

Os derrames cavitários são classificados em:

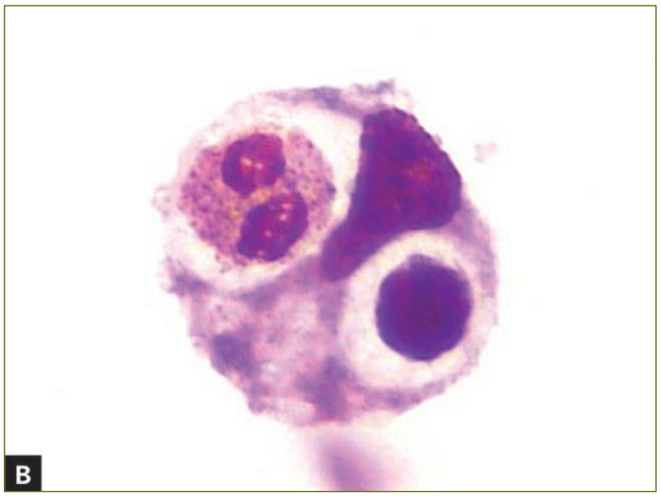
- **Transudatos**: líquidos de baixo conteúdo proteico resultantes do aumento da pressão hidrostática capilar, provocando "acúmulo" secundário a doenças sistêmicas, como cirrose hepática e insuficiência cardíaca congestiva.
- **Exsudatos**: são produzidos em consequência de alguma doença que afete diretamente a membrana pleural, acometendo o mesotélio por processos geralmente neoplásicos, inflamatórios ou infecciosos.

A diferenciação entre transudato e exsudato é feita com base em critérios de Light et al. (1972), nos quais se observa a relação da proteína do líquido pleural com a proteína sérica. Se o resultado for abaixo de 0,5g/dL, é exsudato. Se a dosagem de proteína no líquido pleural for maior que 3,0g/dL, também é exsudato. Abaixo de 2,5g/dL, indica transudato. Caso a relação LDH do líquido pleural com o LDH sérico seja maior que 0,6 e/ou o LDH no líquido pleural seja acima de 200μ/L, há exsudato. Se o LDH do líquido pleural for maior que dois terços do limite superior da normalidade da LDH sérico, também sugere de ser exsudato.

LÍQUIDO PLEURAL

DEFINIÇÃO

Os pulmões e a cavidade torácica são revestidos pela pleura, e o espaço entre as membranas pleural parietal e pleural visceral contém um ultrafiltrado de plasma denominado líquido pleural. Este costuma se apresentar em pequena quantidade, de 1 a 20mL, com baixa concentração de proteínas e células. O líquido pleural normal apresenta-se com aspecto claro e amarelo-pálido. A solicitação de coleta para ensaios laboratoriais do líquido pleural é rotineiramente feita para diferenciar transudatos de exsudatos nos derrames pleurais. Quando ocorre algum dano à cavidade pleural, as células mesoteliais são ativadas, tornando-se fagocíticas e podem produzir várias citocinas que estimulam a resposta inflamatória. Inflamações e outras alterações na pleura podem ser iniciadas pela introdução de microrganismos, células estranhas, sangue, ar ou proteínas.



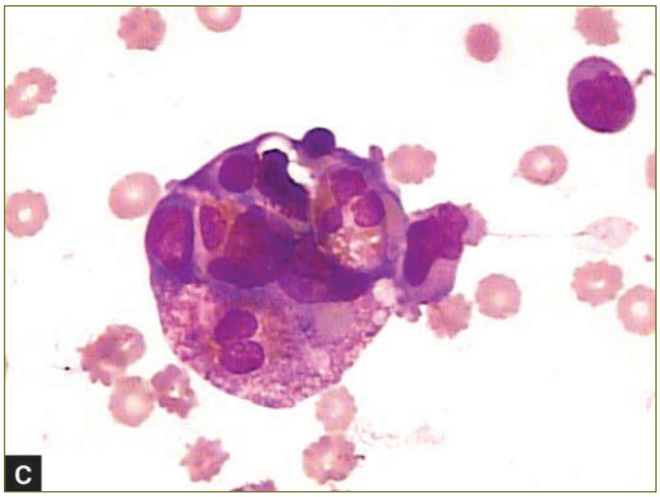


Figura 6.19 (**A** a **C**) Macrófagos reativos. Macrófagos apresentando fagocitose de várias células sanguíneas em seu citoplasma ou exibindo morfologia multinuclear. Observado em processos inflamatórios graves

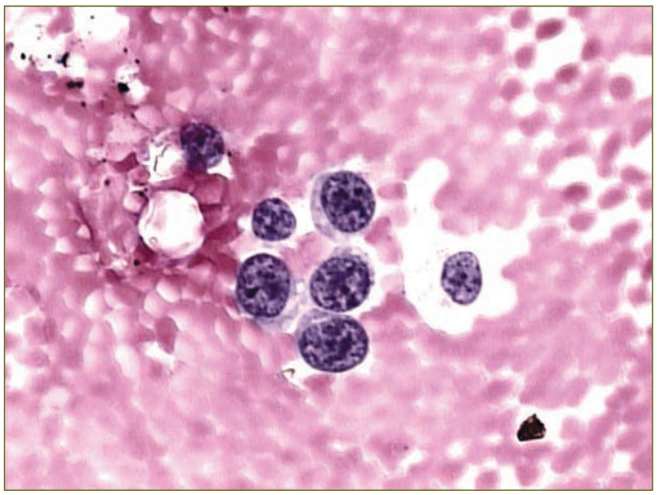


Figura 6.20 LCR: neoplasia maligna de pequenas células redondas (1.200×)

Fonte: gentilmente cedida pelas Dr[as] Dayse Lima e Graça Mattos.

EXAME FÍSICO

Antes e após a centrifugação da amostra, deve-se observar a cor e o aspecto do líquido pleural. As características auxiliam na identificação da etiologia do derrame. O aspecto turvo, branco, está relacionado com a presença de leucócitos e indica infecção bacteriana. Geralmente, o aspecto leitoso está associado ao material quiloso. Quando ocorre ruptura de abscesso amebiano hepático, o líquido pleural costuma se apresentar com aspecto marrom. Já o aspecto preto é observado nas aspergiloses.

O aspecto sero-hemático sugere neoplasia, embolia pulmonar ou hemotórax (traumatismo). Ocorre também em pacientes em hemodiálise (talvez pela ação da heparina usada neste procedimento).

Quando o hematócrito do líquido for menor que 1%, o resultado não se associa a sangramento importante. No entanto, quando o hematócrito do líquido é maior que 1%, isso pode sugerir derrames neoplásicos, traumáticos e embolia pulmonar. Contudo, se o hematócrito do líquido for maior que 50% do plasma, trata-se de um hemotórax (Figura 6.22).

EXAME CITOLÓGICO

Contagem global dos leucócitos

A contagem global de leucócitos pode ser processada em câmara de Neubauer ou em aparelho automatizado desde que sejam descontadas as células nucleadas que não os leucócitos. A contagem global dos leucócitos é uma etapa muito importante para fazer a diferenciação da amostra entre transudato e exsudato. Geralmente, a contagem global dos leucócitos é superior a 1.000 células/mL nos exsudatos e inferior a 1.000 células/mL nos transudatos.

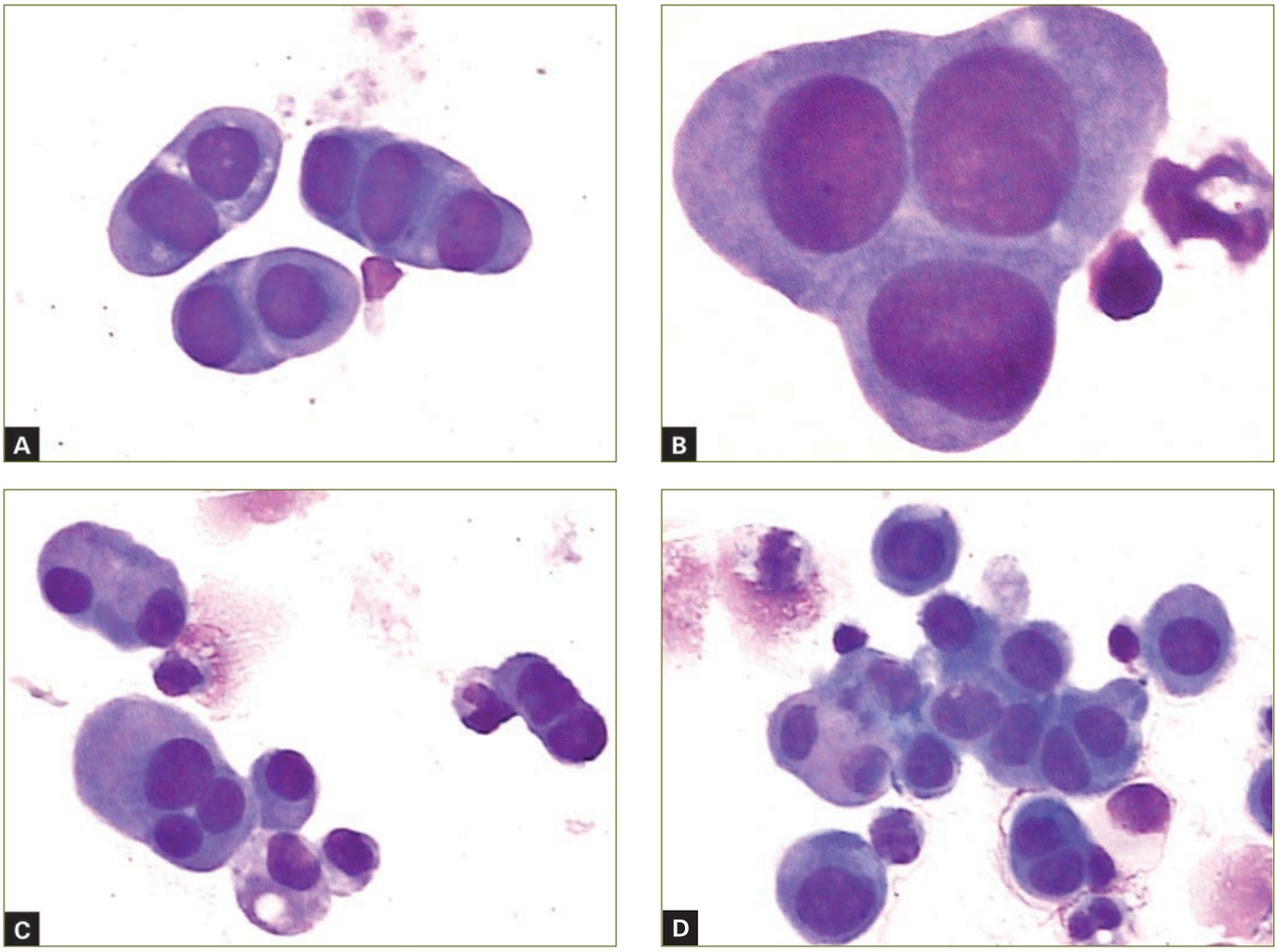


Figura 6.21 (**A** a **D**) Líquido cavitário. Células mesoteliais reativas com formas multinucleadas e núcleos excêntricos, algumas com citoplasma vacuolizado e formas normais (2.000×)

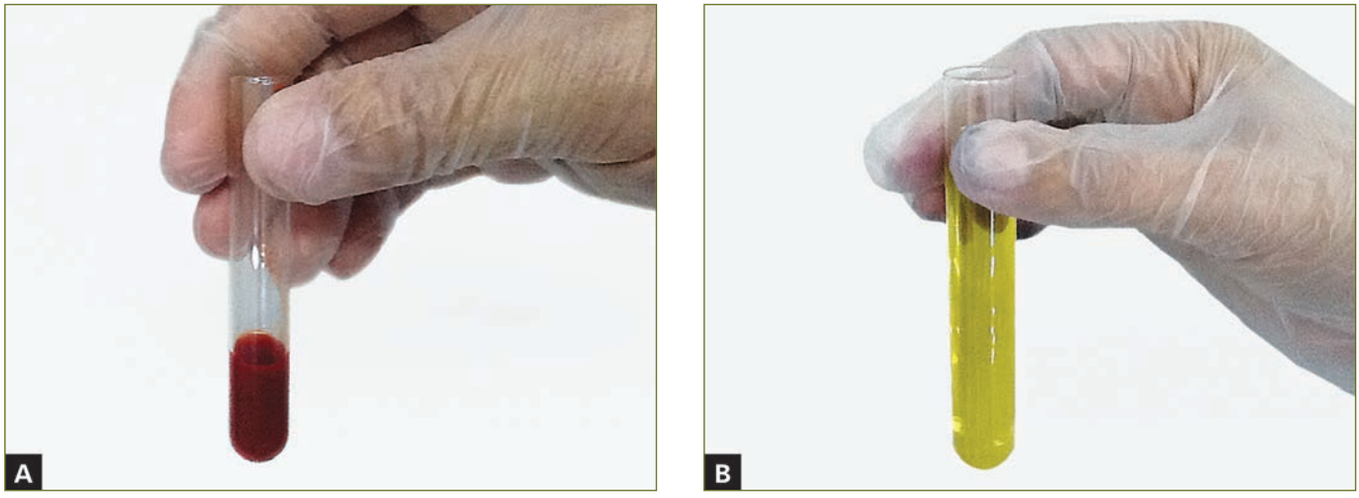


Figura 6.22 (**A** e **B**) Líquido pleural: hemotórax. O hematócrito do líquido é maior que 50% do plasma (**A**). Líquido pleural: claro, amarelo pálido, aspecto normal (**B**)

Preparo da lâmina

De preferência, as lâminas para leitura de citologia inflamatória devem ser feitas utilizando-se uma citocentrífuga ou na câmara de Suta. Esta possibilita a concentração das células por um sistema de filtros de papel que absorve a parte líquida da amostra quando a quantidade de leucócitos presentes for pequena.

EXAME MICROSCÓPICO (CONTAGEM DIFERENCIAL)

A análise diferencial de células é o teste hematológico mais importante para o diagnóstico da etiologia do derrame pleural. Entretanto, a contagem diferencial de leucócitos em um líquido pleural infectado pode apresentar valor limitado, pois revela o estágio atual de uma infecção. As células associadas ao líquido pleural são linfócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, hemácias, células mesoteliais, células plasmáticas, células neoplásicas (células tumorais), blastos e células linfomatosas. Nos transudatos, a citologia diferencial do líquido pleural apresenta 80% de mononucleares e 20% de polimorfonucleares, enquanto nos exsudatos ocorre predomínio de polimorfonucleares (Figuras 6.23 a 6.27).

Processos inflamatórios e infecciosos, com exceção da tuberculose (geralmente com contagem abaixo de 5%), facilitam sua descamação promovendo concentrações que, por vezes, se apresentam como grumos celulares. Tais células também são frequentes nos derrames por neoplasias, entretanto são frequentes nos transudatos. É comum confundi-las com macrófagos e, por vezes, são identificadas falsamente como células neoplásicas (Figuras 6.28 a 6.30).

A descoberta de células neoplásicas pela citologia diferencial, ou pela biópsia da pleura parietal, é uma indicação de metástase ou tumor local. A imunocitoquímica com anticorpos de marcadores tumorais e a análise cromossômica são auxiliares diagnósticos. Mais de 80% dos derrames pleurais neplásicos são positivos para pesquisa de células neoplásicas, principalmente os adenocarcinomas (Figura 6.31).

Geralmente, o envolvimento pulmonar nos linfomas é assintomático, tornando o diagnóstico clínico bastante difícil. O achado no pulmão não é raro em necrópsias de pacientes com

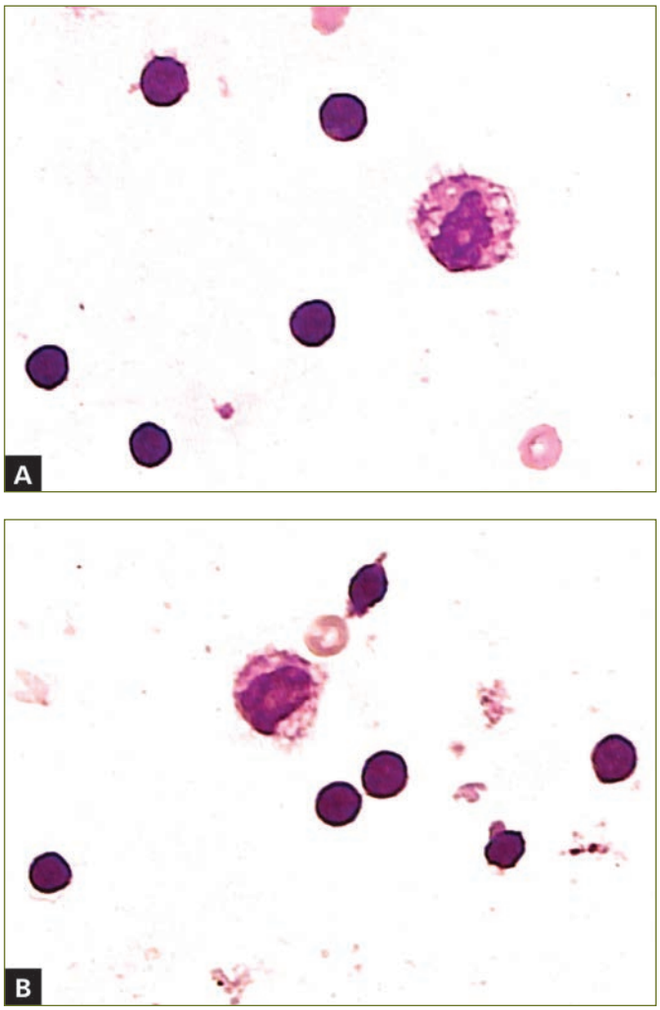


Figura 6.23 (**A** e **B**) Líquido pleural: citologia normal, com predomínio de monomorfonucleares (2.000×)

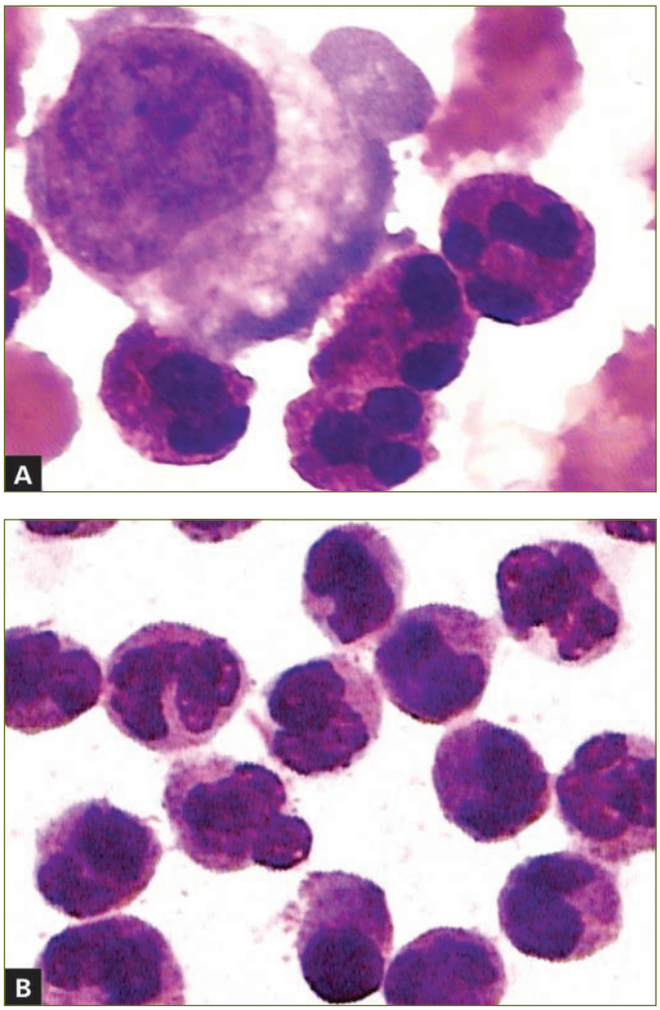


Figura 6.24 (**A** e **B**) Líquido pleural: neutrófilos. O aumento de neutrófilos no líquido pleural sugere processos inflamatórios agudos das pleuras (pneumonia, pancreatite, empiema, infartos ou fase precoce da tuberculose) ou início de um processo viral (2.000×)

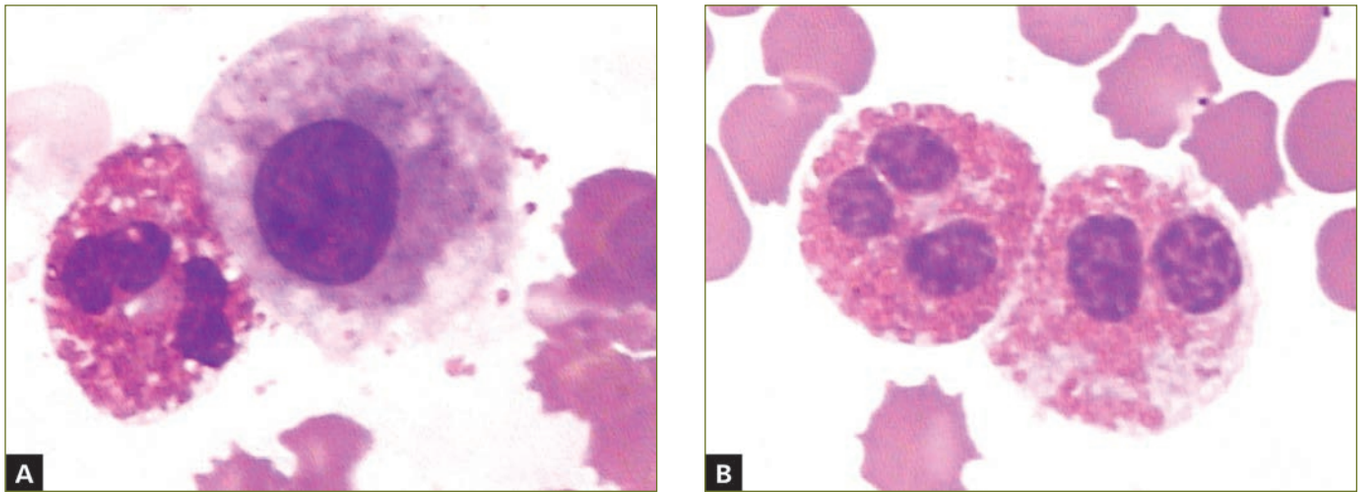


Figura 6.25 (**A** e **B**) Líquido pleural: eosinófilos. Quando a contagem de eosinófilos é menor que 10% do total de leucócitos, isso pode sugerir doença benigna, associada a ar ou sangue no espaço pleural (pneumotórax, hemotórax, reação a medicamentos). Entretanto, quando a contagem é superior a 10%, pode haver doenças parasitárias, infecções por fungos e síndromes de hipersensibilidade (2.000×)

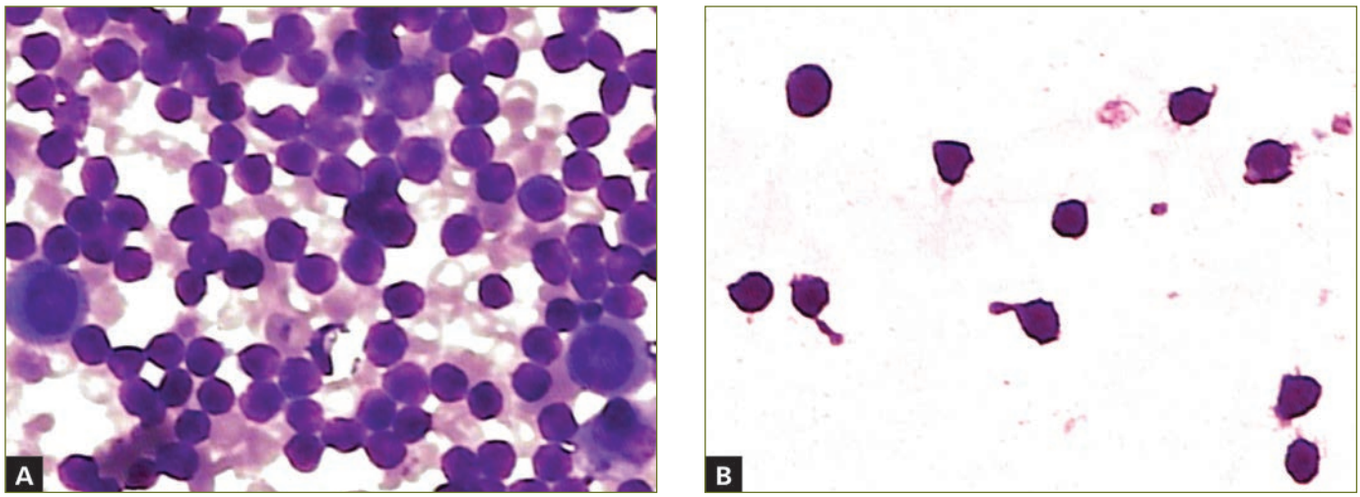


Figura 6.26 (**A** e **B**) Líquido pleural: linfócitos. A linfocitose é comum na tuberculose (geralmente acima de 90%). Na fase inicial, antes de duas semanas, pode haver predominância de neutrófilos. Há predomínio de linfócitos no liquido pleural também no quilotórax, no linfoma, na sarcoidose, na LES e na doença viral (2.000×)

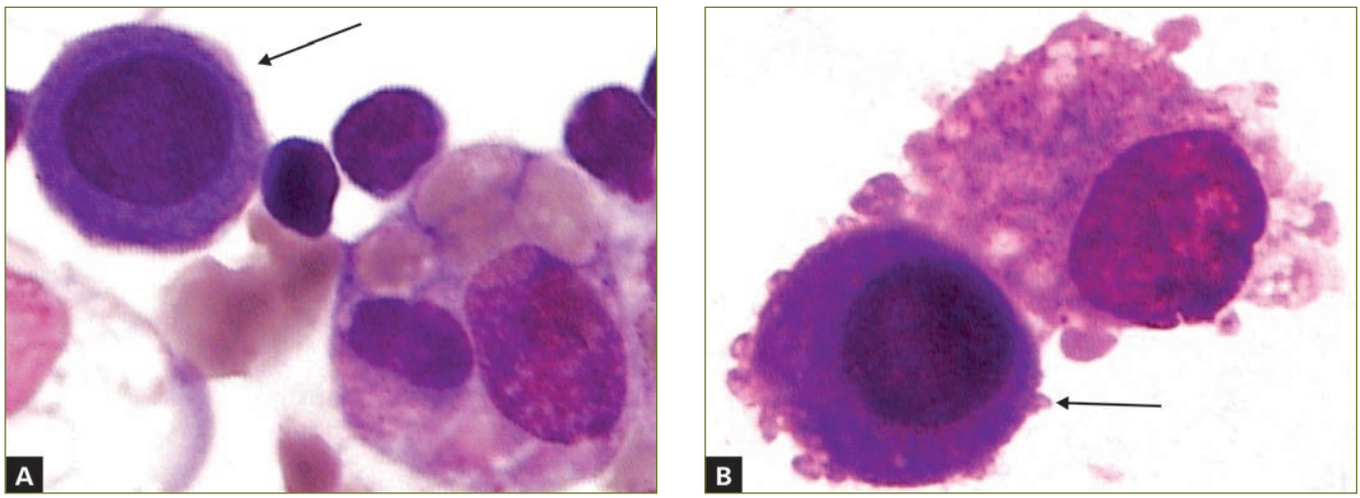


Figura 6.27 (**A** e **B**) Mesoteliócitos. A célula mesotelial pleural (*setas*) é uma célula bastante diferenciada e apresenta múltipla capacidade funcional. Além disso, os mesoteliócitos podem se unir vigorosamente uns aos outros sem se afetar

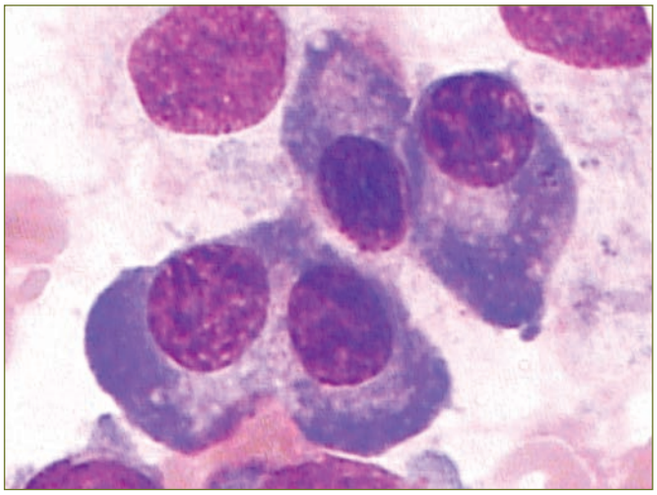


Figura 6.28 Líquido pleural: células plasmáticas. Presente em pequeno número na tuberculose (2.000×)

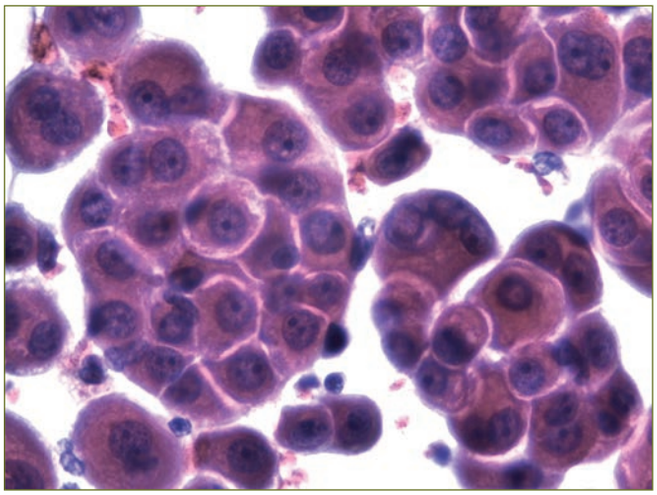


Figura 6.29 Líquido pleural: mesotelioma maligno (1.200×)
Fonte: gentilmente cedida pelas Dr[as] Dayse Lima e Graça Mattos.

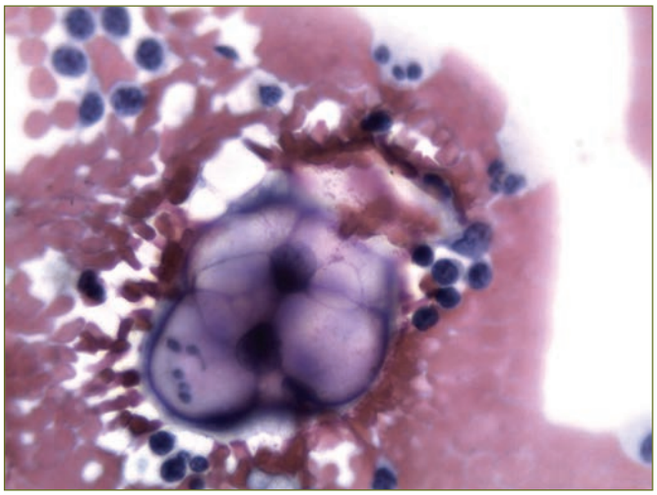


Figura 6.30 Líquido pleural: adenocarcinoma metastático (1.200×)
Fonte: gentilmente cedida pelas Dr[as] Dayse Lima e Graça Mattos.

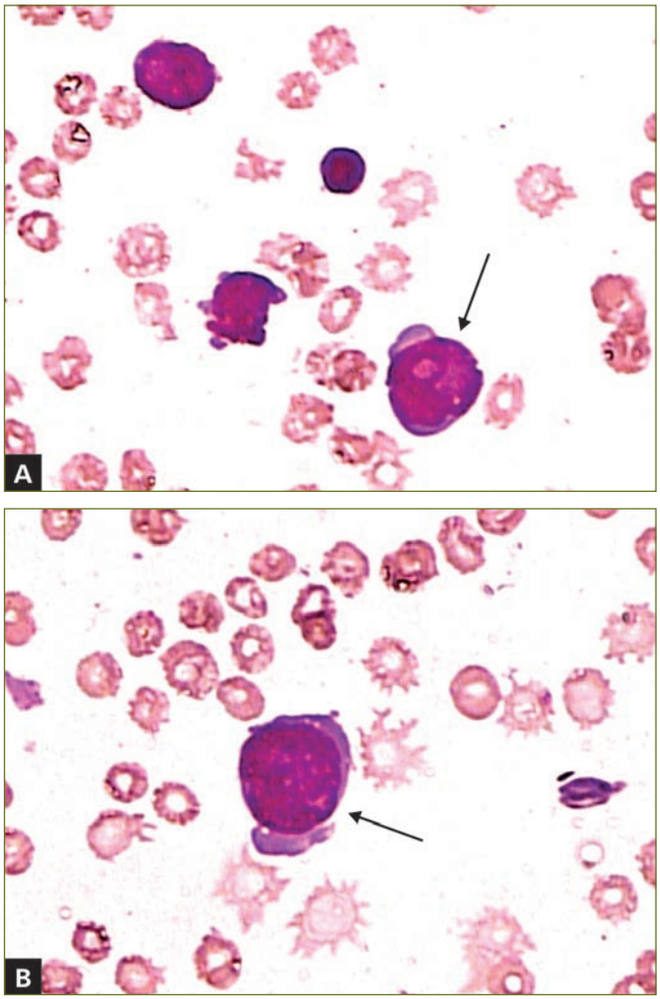
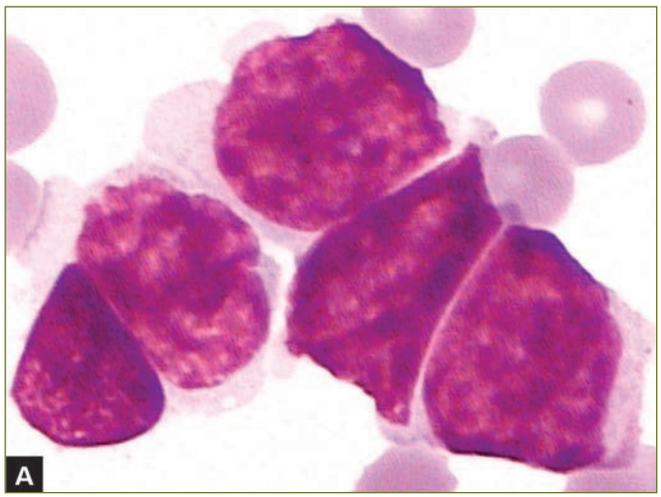
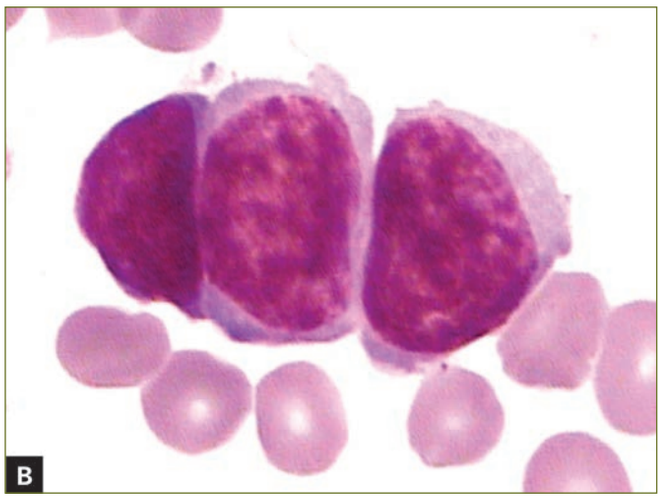


Figura 6.31 (**A** e **B**) Líquido pleural: blastos linfoides. A presença de blastos (*setas*) no derrame pleural é mais comum na leucemia linfoide aguda de células T (LLA-T). Esta leucemia costuma cursar com massas mediastinais e pode infiltrar o líquido pleural (2.000×)

linfoma apresentando radiografias de tórax normais. Os linfomas com comprometimento pulmonar podem ser classificados em quatro categorias: linfoma pulmonar primário, linfoma pulmonar secundário ou recorrente, linfoma em pacientes com alterações linfoproliferativas pós-transplante e linfomas relacionados com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Entretanto, os linfomas pulmonares primários são raros e, em geral, do tipo linfoma não Hodgkin (LNH) (Figura 6.32). Na AIDS, os linfomas que envolvem os pulmões costumam ser do tipo LNH de alto grau, com prognóstico muito ruim. Os mais frequentes são da forma secundária ou recorrente, do tipo doença de Hodkin.

Nos transudatos, pode ocorrer predomínio de macrófagos, mesmo apresentando baixa celularidade. É comum o surgimento de eritrófagos em derrame pleural hemorrágico entre 12 e 24h após o primeiro sangramento, o qual permanece até uma semana. Os macrófagos contendo hemossiderina, conhecidos como siderófagos, surgem de 4 a 7 dias após a hemorragia e podem formar cristais de hematoidina aproximadamente 15 dias após a primeira hemorragia. Macrófagos reativos e vacuolizados também podem ser observados em processos infecciosos e em processos inflamatórios graves (Figuras 6.33 e 6.34).





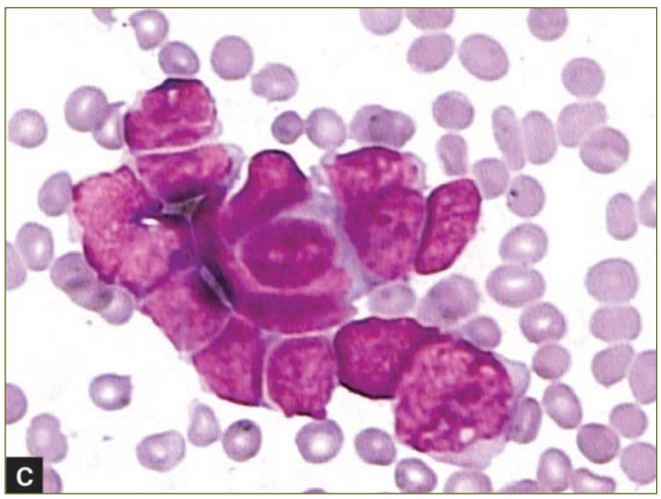
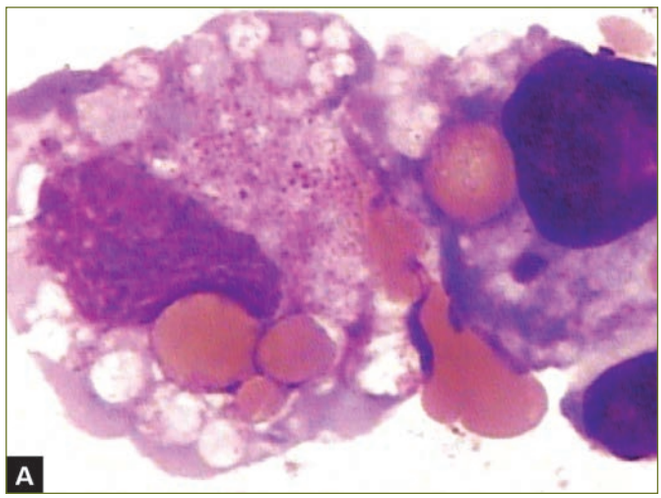


Figura 6.32 (**A** a **C**) Líquido pleural: células linfomatosas; linfoma não Hodgkin (2.000×)



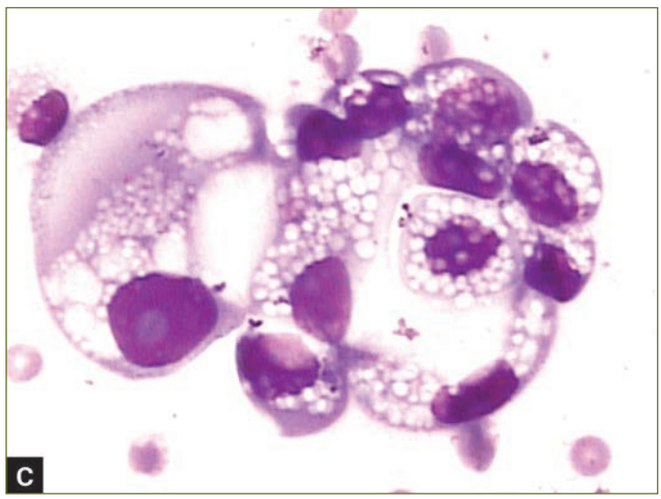


Figura 6.33 (**A** a **C**) Líquido pleural: eritrófagos e macrófagos vacuolizados (2.000×)

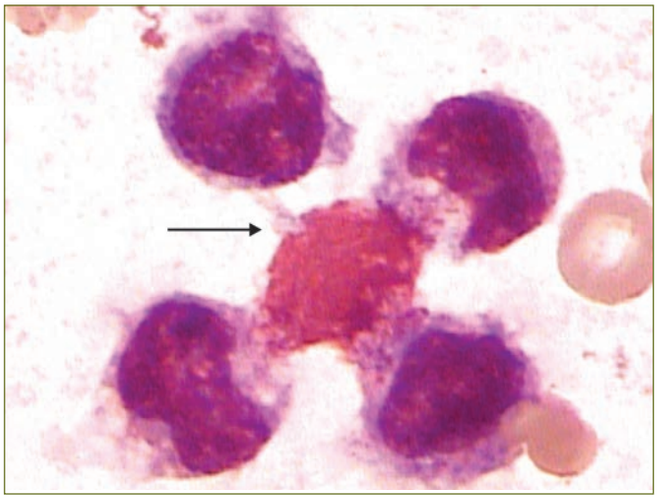


Figura 6.34 Líquido pleural: macrófagos fagocitando resíduo celular (*seta*) (2.000×)

Solicita-se a pesquisa de células LE (Figura 6.35) no líquido pleural na suspeita de doença do colágeno, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou a artrite reumatoide (AR). A presença de células LE é comum em casos de pleurite lúpica. Exames mais específicos como dosagem de fator reumatoide, anticorpos antinucleares, complemento e imunocomplexos devem ser solicitados no líquido pleural se a suspeita for derrame pleural devido ao LES.

LÍQUIDO PERICÁRDICO

DEFINIÇÃO

Costuma se apresentar em pequena quantidade (cerca de 10 a 50mL) e localiza-se entre as membranas do pericárdio. No entanto, o líquido pericárdico pode aumentar de volume (derrame) e prejudicar as funções cardíacas, devido ao pequeno espaço entre as membranas, causando aumento da pressão intrapericárdica, como o tamponamento. A pressão impede que o coração expanda completamente e se encha de sangue em sua capacidade máxima, o que promove insuficiência de oxigênio nos tecidos. O derrame pericárdico pode constituir um achado no exame de rotina, como a tomografia de tórax, o ecocardiograma ou a radiografia de tórax. Em geral, o derrame pericárdico é completamente assintomático e pode ter como causas mais comuns pericardites viral, bacteriana, tuberculosa e fúngica, carcinomas metastáticos, linfomas, infarto do miocárdio, hemorragias por traumatismos, distúrbios da coagulação, LES e distúrbios metabólicos.

ASPECTO

Normalmente, o líquido pericárdico normal e o transudato demonstram aspecto claro e amarelo-pálido. Punções cardíacas acidentais e o uso indevido de anticoagulantes promovem aspecto macroscopicamente sanguinolento. Os derrames provocados por infecções e neoplasias são turvos e podem apresentar sinais de sangue. Além disso, o derrame de aspecto leitoso pode significar efusão quilosa.

CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS

Na análise quantitativa dos leucócitos do líquido pericárdico normal, a citometria deve ser inferior a 500 leucócitos/mm^3 e pode ser processada em câmara de Neubauer ou em aparelho automatizado, desde descontadas as células nucleadas que não sejam leucócitos. Contagens superiores a 1.000 leucócitos/mm^3 com evidente aumento dos neutrófilos sugerem endocardite bacteriana.

A contagem diferencial dos leucócitos no líquido pericárdico normal demonstra o predomínio de monomorfonucleares e contagens abaixo de 25% de polimorfonucleares. No exsudato pericárdico, o estudo citológico torna-se muito importante no surgimento de células de aspecto morfológico suspeito, determinando a indicação para exames citopatológicos (Figura 6.36). As células neoplásicas metastáticas mais frequentes no líquido pericárdico são de carcinoma de mama e de pulmão.

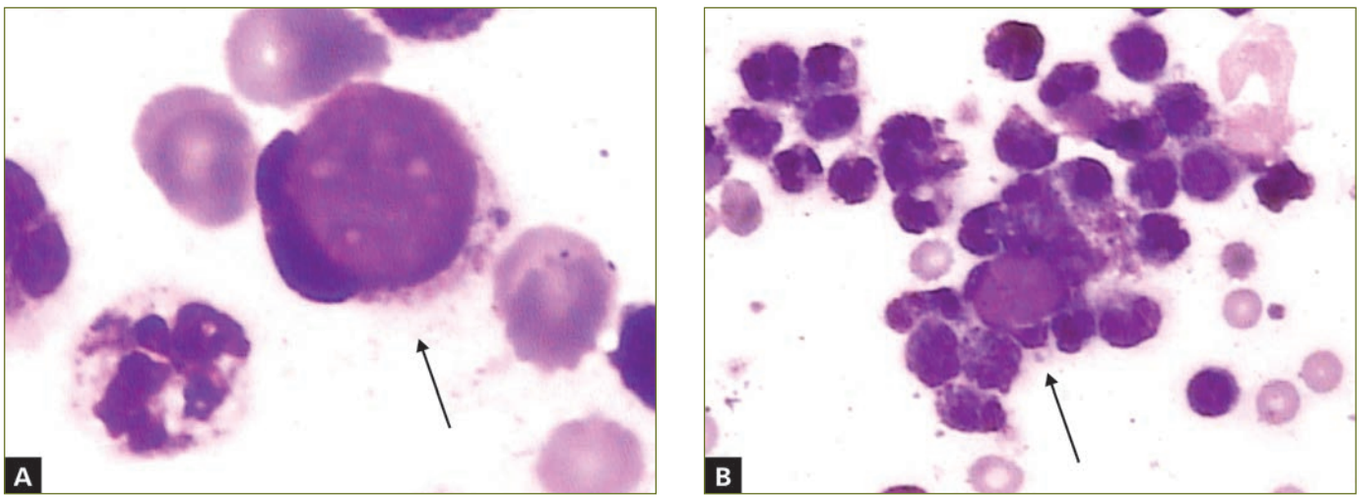


Figura 6.35 (**A** e **B**) Líquido pleural: células LE (*setas*) (2.000×)

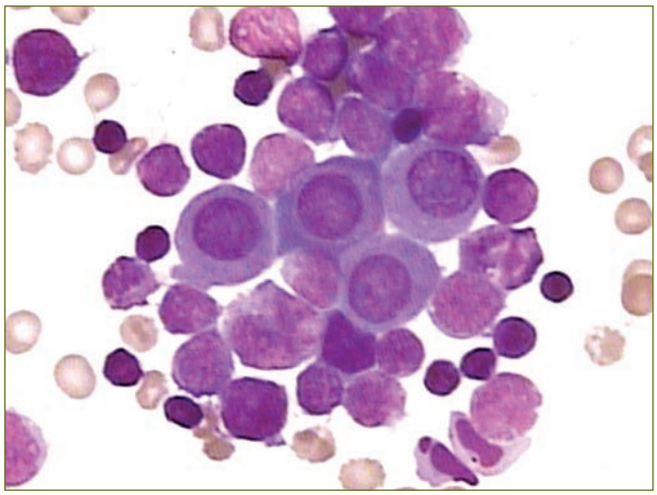


Figura 6.36 Derrame pericárdico: células mesoteliais, macrófagos e predomínio de monomorfonucleares (1.200×)

CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS

A contagem global dos leucócitos é realizada comumente em câmara de Neubauer, mas também pode ser realizada em qualquer outro retículo de contagem. Quando a contagem ultrapassa de 500 leucócitos/μL, sugere, entre outras alterações, peritonite bacteriana ou cirrose. No líquido peritoneal normal, a contagem de leucócitos não costuma ultrapassar 350 leucócitos/μL.

A contagem global de células é uma etapa muito importante para fazer a diferenciação da amostra entre transudato e exsudato. Os tipos celulares que podem ser encontrados no líquido peritoneal são os eritrócitos, os macrófagos, os neutrófilos, os linfócitos, os eosinófilos, as células neoplásicas e as células mesoteliais. As células neoplásicas metastáticas mais comuns são as de origem gastrintestinal, da próstata ou dos ovários. A perfuração intestinal é confirmada no exsudato ascítico com a presença de resíduos alimentares do tipo cristais de bilirrubina, de colesterol, de oxalato de cálcio, pelos vegetais, fibras musculares e grãos de amido (Figuras 6.37 a 6.42).

LÍQUIDO PERITONEAL/ASCÍTICO

DEFINIÇÃO

O aumento de líquido livre na cavidade peritoneal acima de 50mL é denominado ascite em vez de líquido peritoneal. O termo ascite provém da palavra grega *askos*, que significa saco ou bolsa. Na maioria dos casos de ascite, o desenvolvimento é lento e gradativo. Os casos de transudatos ascíticos mais frequentes ocorrem na cirrose hepática, enquanto a perfuração intestinal, a ruptura de apêndice e a neoplasia são os casos mais comuns nos exsudatos ascíticos. O surgimento rápido de ascite sugere a possibilidade de causas extra-hepáticas, geralmente cardiovasculares. Quando o emagrecimento acentuado acompanha a ascite, devem ser consideradas causas como tuberculose peritoneal e carcinomatose. Os fatores de risco relacionados com as causas primárias de ascite são o abuso de álcool, os vírus das hepatites B, C e D e a história familiar.

ASPECTO

O aspecto e a cor devem ser observados antes e após a centrifugação no líquido peritoneal. Quando normal, apresenta-se transparente e amarelo claro. Quando turvo, sugere infecções bacterianas. A coloração esverdeada surge em perfurações do trato gastrintestinal, pancreatite e colecistite, e o aspecto leitoso que não clareia após a centrifugação pode sugerir material quiloso, presente em obstrução de vasos linfáticos. Além disso, os líquidos com sangue são vistos após traumatismos, doenças intestinais, tuberculose e neoplasias.

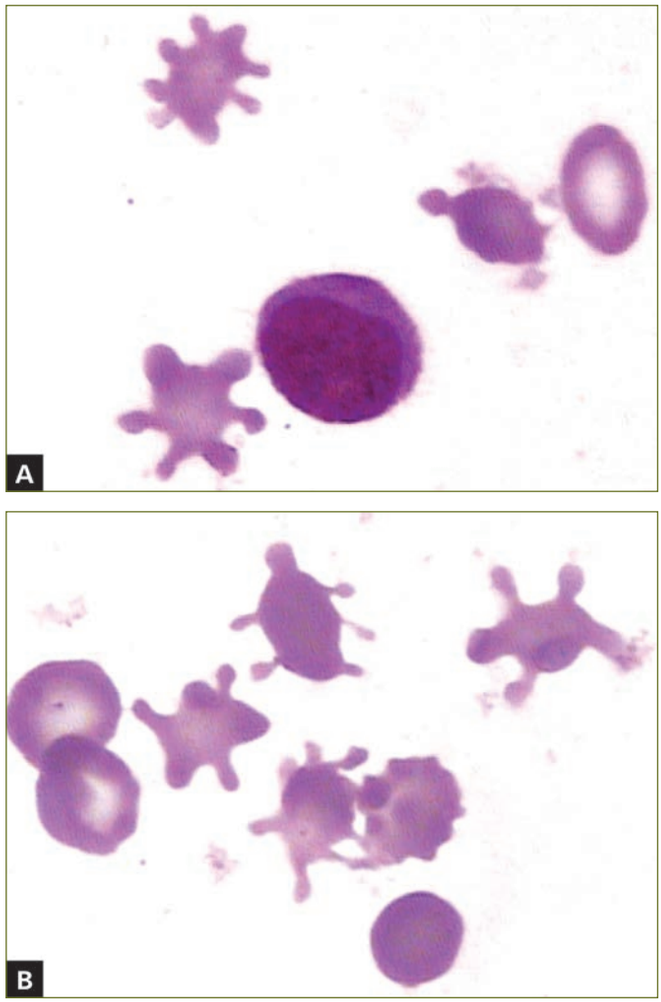


Figura 6.37 (**A** e **B**) Ascite: hemácias com morfologia alterada no derrame ascítico hemorrágico (2.000×)

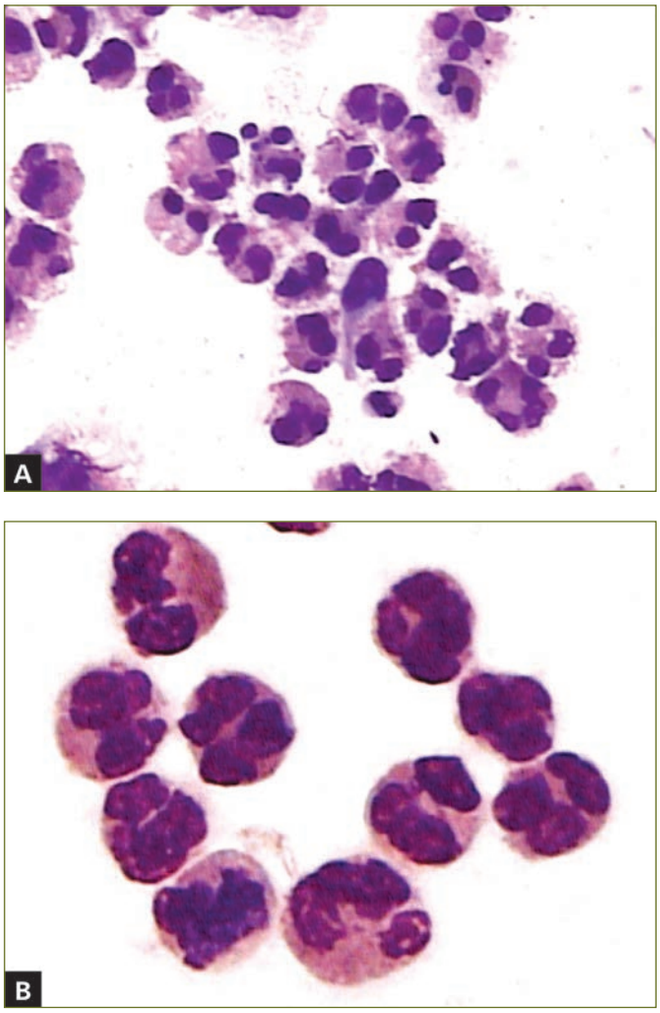


Figura 6.38 (**A** e **B**) Ascite: contagem de neutrófilos superior a 250 células/μL ou contagem de neutrófilos superior a 50% (1.200×)

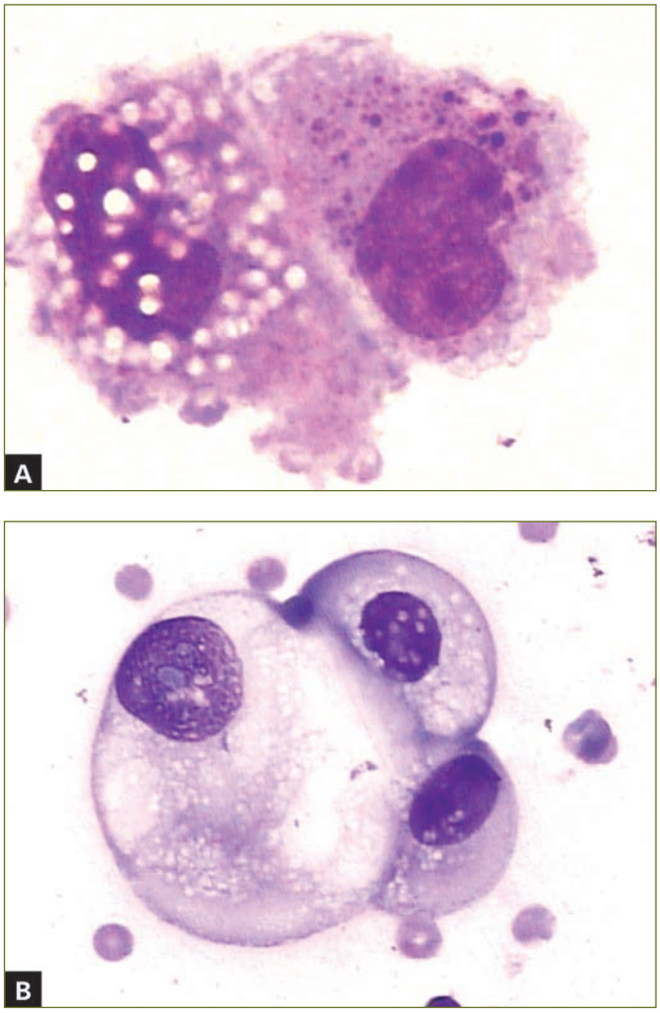


Figura 6.40 (**A** e **B**) Ascite: macrófago com pequenas vacuolizações e outro com resíduos carbonáceos (**A**). Três macrófagos com grandes vacuolizações (**B**) (2.000×)

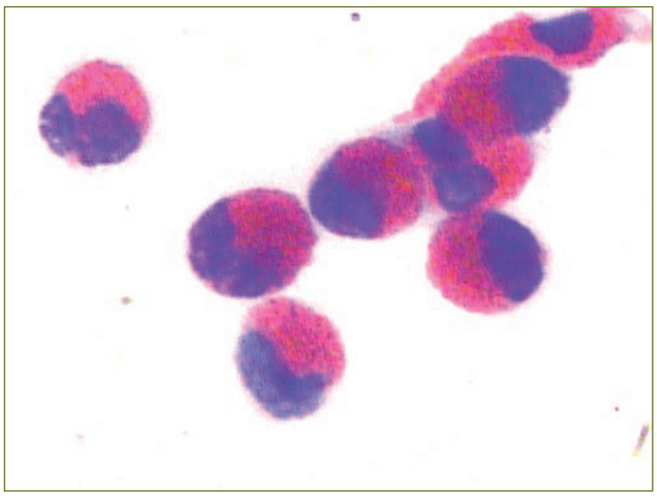


Figura 6.39 Ascite: evidente eosinofilia (1.200×)

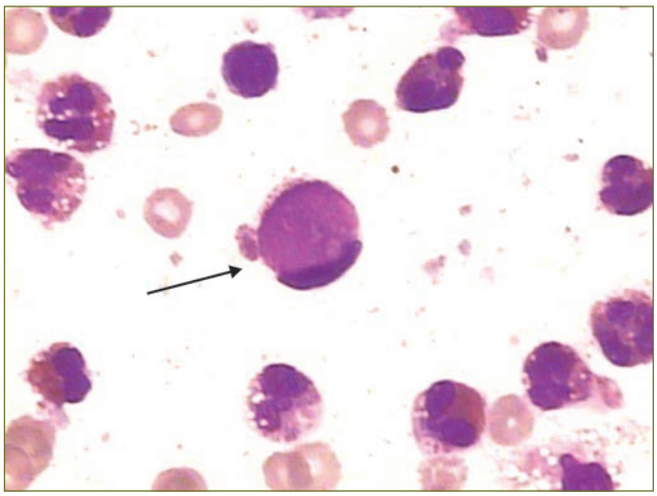


Figura 6.41 Ascite: célula LE (*seta*) (2.000×)

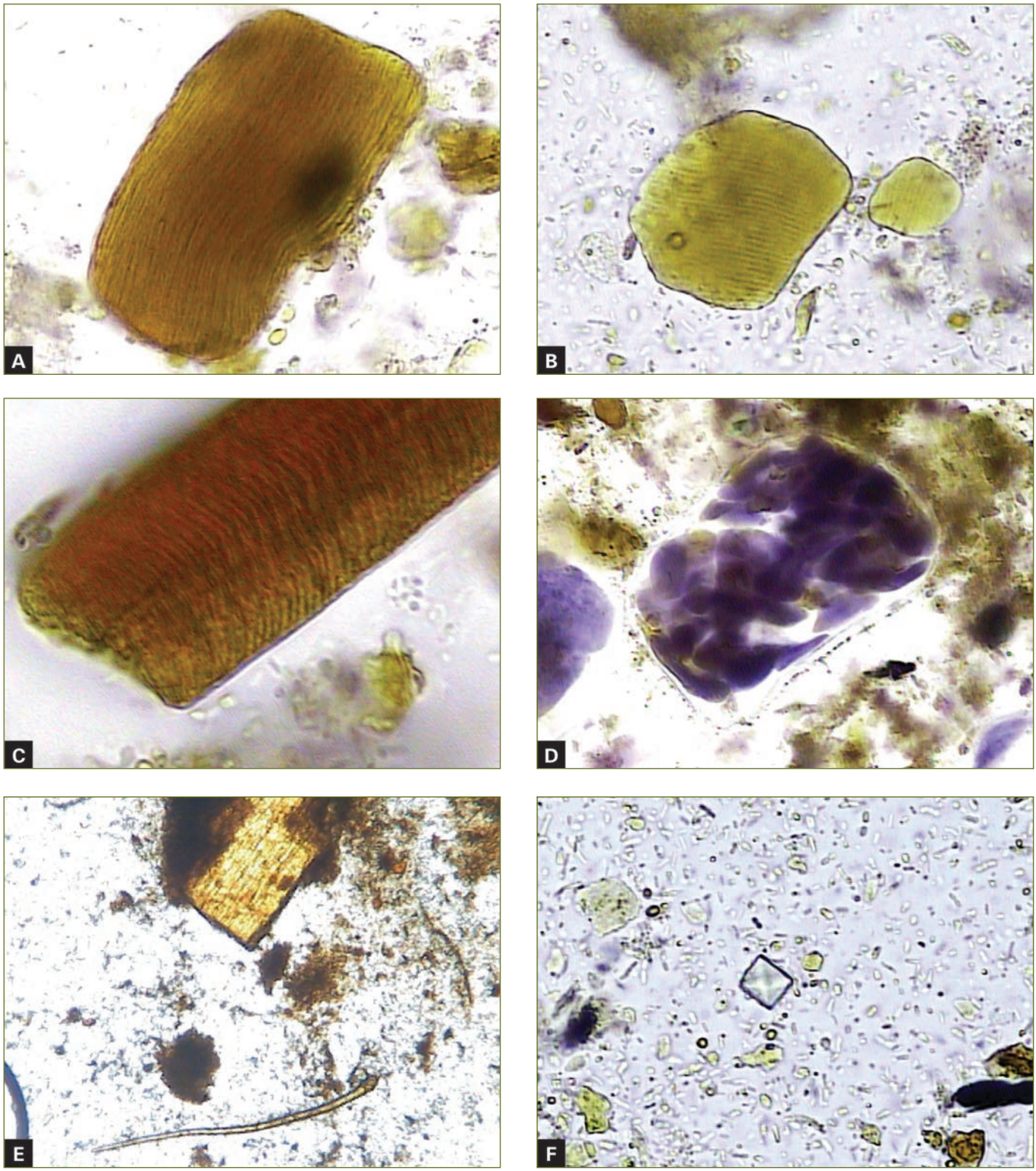


Figura 6.42 (**A** a **F**) Resíduos alimentares na perfuração intestinal: cristais de bilirrubina (**A**), de colesterol (**B**), fibras musculares (**C**), grãos de amido (**D**), pelos vegetais (**E**) e cristal de oxalato de cálcio (**F**)

LÍQUIDO SINOVIAL

DEFINIÇÃO

Encontrado nas cavidades articulares, o líquido sinovial é um filtrado de plasma presente em condições normais em volume inferior a 3,5mL. É um dos elementos que formam o sistema locomotor, junto com os ossos, músculos, ligamentos e articulações. Seu aspecto altamente viscoso deve-se ao mucopolissacarídeo ácido hialurônico, produzido pelas células da membrana sinovial. O termo *synovium* na língua latina significa "com ovo"; refere-se à clara do ovo com o aspecto viscoso semelhante ao líquido sinovial. Além da função de lubrificante nas articulações, também fornece nutrientes para a cartilagem e protege contra o choque de compressão que ocorre durante atividades. Os níveis de glicose e ácido úrico são iguais ao soro, enquanto os níveis de proteína são 25% dos níveis séricos. O líquido sinovial é classificado em cinco grupos de acordo com o significado patológico das doenças articulares: não inflamatórios, inflamatórios, sépticos, induzidos por cristais e hemorrágicos:

- **Grupo I – não inflamatórios**: apresenta-se transparente, amarelo, com boa viscosidade. Contagem de leucócitos abaixo de 5.000 leucócitos/mm^3 e neutrófilos abaixo de 30%. Ocorre na doença articular degenerativa, em traumatismos, na osteocondrite dissecante e na artropatia inicial ou em regressão.
- **Grupo II – inflamatórios**: apresenta-se com aspecto opaco, amarelado, e pouca viscosidade. Contagem de leucócitos entre 2.000 a 100.000 leucócitos/mm^3 e neutrófilos superiores a 90%. Ocorrem na artrite reumatoide, na sinovite, na síndrome de Reiter, na espondilite ancilosante, na febre reumática, no lúpus eritematoso e na esclerose sistêmica.
- **Grupo III – sépticos**: apresenta-se com aspecto opaco, cor verde-amarelada, e pouca viscosidade. Contagem de leucócitos entre 10.000 e 200.000 leucócitos/mm^3 e neutrófilos superiores a 90%. Glicose diminuída e cultura positiva. Ocorre nas infecções bacterianas piogênicas.
- **Grupo IV – induzidos por cristais**: apresenta-se com aspecto opaco ou leitoso. Contagem de leucócitos até 50.000 leucócitos/mm^3. Presença de cristais e dosagem de ácido úrico elevada. Ocorre na gota induzida por cristais.
- **Grupo V – hemorrágicos**: apresenta-se com aspecto opaco, cor vermelha e pouca viscosidade. Contagem de leucócitos geralmente abaixo de 5.000 leucócitos/mm^3 e neutrófilos abaixo de 50%. Presença de numerosas hemácias. Ocorre no traumatismo, na hemofilia ou em outras diáteses hemorrágicas, no hemangioma e em outras neoplasias benignas.

ASPECTO

O aspecto normal é cristalino, de cor amarelo-pálido ou incolor, com alta viscosidade (Figuras 6.43 e 6.44). É um dos parâmetros mais importantes do exame físico. A turvação acontece na hipercelularidade ou por presença de cristais e o líquido sinovial esverdeado pode estar associado à artrite séptica por *Haemophilus influenzae*, à artrite reumática crônica e à gota aguda. O aspecto é hemático em fraturas, tumores, traumatismos externos ou de punção e hemofilia, na artrite reumática crônica ou gotosa aguda ou mais raramente no lúpus eritematoso sistêmico.

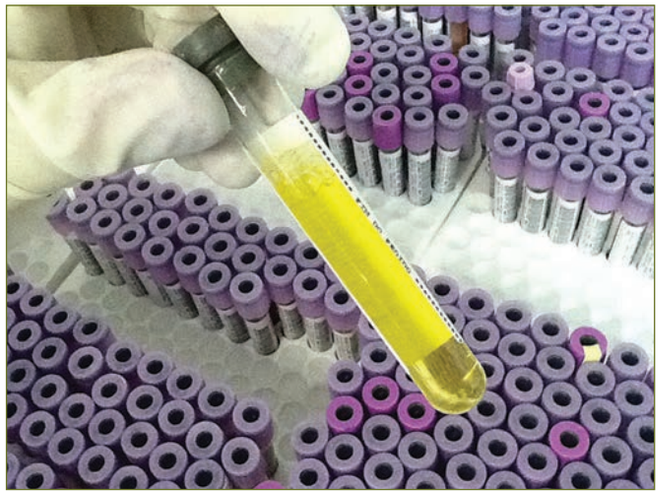


Figura 6.43 Líquido sinovial: cor amarelada e aspecto claro e límpido

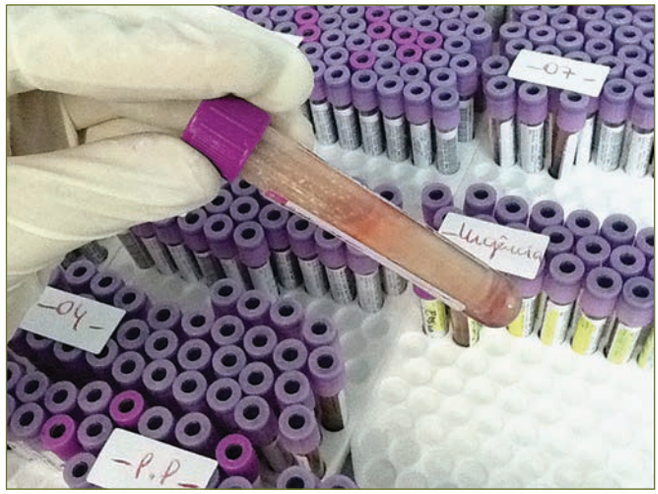


Figura 6.44 Líquido sinovial: cristal de ácido úrico e aspecto turvo

Tipos de cristais no líquido sinovial

O exame para pesquisa de cristais deve ser realizado em lâmina logo depois da coleta, para garantir a integridade dos cristais devido à mudança do pH e da temperatura. Os cristais mais comuns observados são de ácido úrico ou do denominado urato monossódico (agulhas intracelulares e extracelulares) (Figura 6.45), associados na maioria dos casos a gota. A hidroxiapatita (pequenas partículas intracelulares e extracelulares) encontrada na degeneração de cartilagem calcificada e o cristal de colesterol (losangos extracelulares) estão a associados a infecção crônica. Já o cristal de oxalato de cálcio (envelope) observado em pacientes em tratamento de diálise renal e o pirofosfato de cálcio (varetas ou quadrados rômbicos) estão associados a pseudogota.

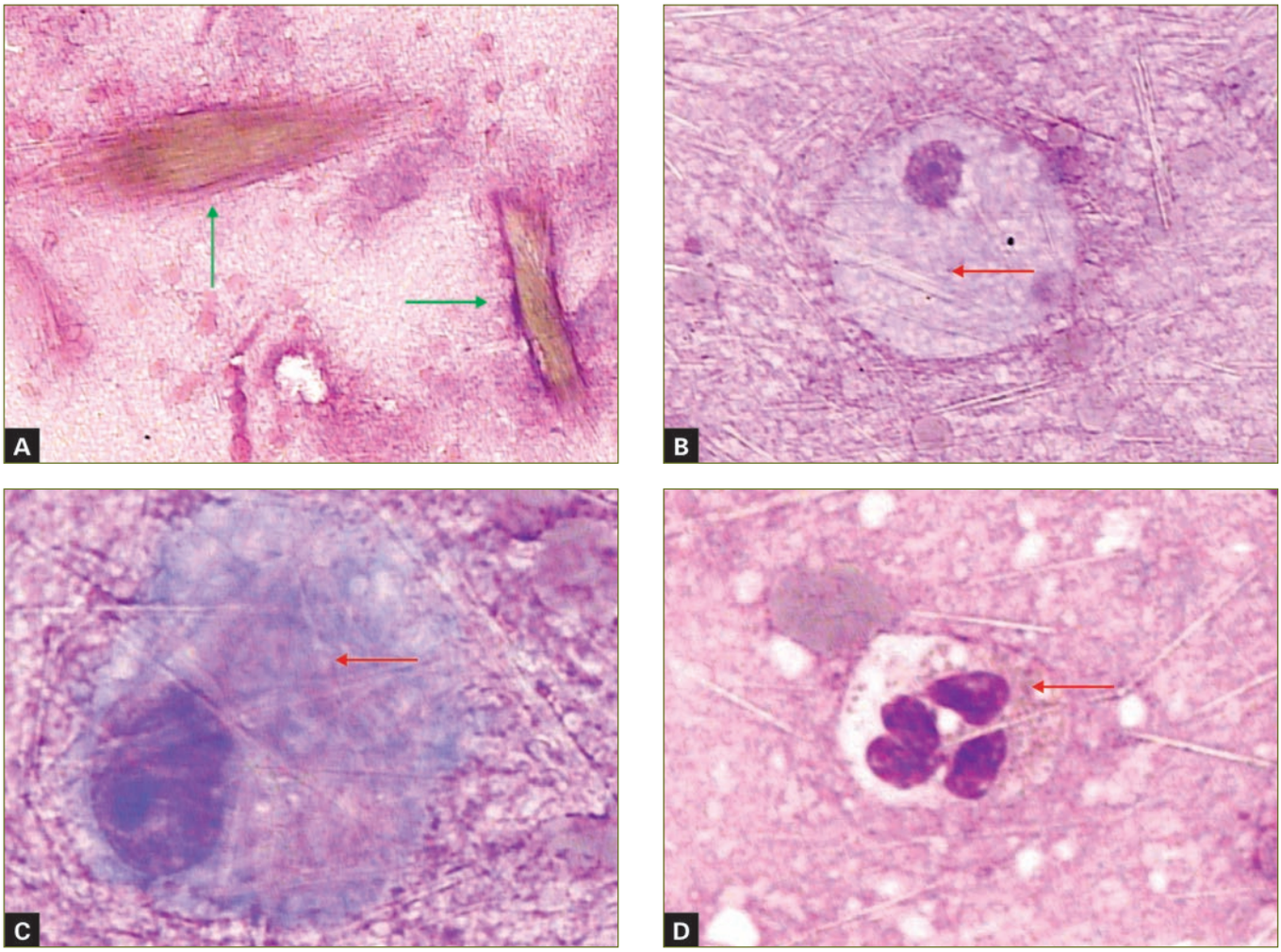


Figura 6.45 (**A** a **D**) Líquido sinovial: cristal de ácido úrico extracelular e em feixe (*seta verde*) e cristal intracelular (*seta vermelha*) (2.000×)

CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS

A análise citológica do líquido sinovial é composta de duas etapas: a citometria, em que é feita a análise quantitativa das células, e a citologia, na qual se realiza a contagem diferencial dos leucócitos. A contagem global dos leucócitos deve ser inferior a 200 leucócitos/mm^3 em condições normais e pode ser processada do mesmo modo que em outros líquidos mencionados neste capítulo, em câmara de Neubauer ou em aparelho automatizado, descontadas as células nucleadas que não sejam leucócitos.

No líquido sinovial, as lâminas apresentam em condições normais o ácido hialurônico precipitado em forma de cristais amorfos de cor avermelhada, semelhantes a cristais de fosfato ou urato amorfo observados em outros fluidos. Em condições inflamatórias e sépticas, esse precipitado tende a diminuir. As lâminas devem ser preparadas em citocentrífugas ou em esfregaço. Assim, os monomorfonucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) representam 80% da contagem diferencial, enquanto os polimorfonucleares contribuem com apenas 20%. Outras anormalidades celulares são células LE, eosinófilos, células de Reiter e células sinoviais de revestimento e de cartilagem (Figuras 6.46 a 6.53).

LAVADO/ESCOVADO BRONCOALVEOLAR

DEFINIÇÃO

É uma técnica de análise de amostras obtidas por lavado/escovado broncoalveolar que fornece informações celulares e microbiológicas do trato respiratório inferior. Utiliza-se bastante em diagnóstico de pacientes com doenças das vias respiratórias, hemorragia alveolar, doença pulmonar intesticial e infecções oportunistas da AIDS. A técnica consiste basicamente em implantar o broncoscópio nas vias respiratórias e injetar, no mínimo, 100mL de solução fisiológica a 0,9% dividida em cinco alíquotas. Coleta-se o produto do lavado logo após cada alíquota injetada e analisada. As amostras são divididas em duas partes, denominadas brônquicas e alveolares. As amostras brônquicas são as primeiras alíquotas aspiradas e as alveolares são os aspirados da 3ª à 5ª alíquotas.

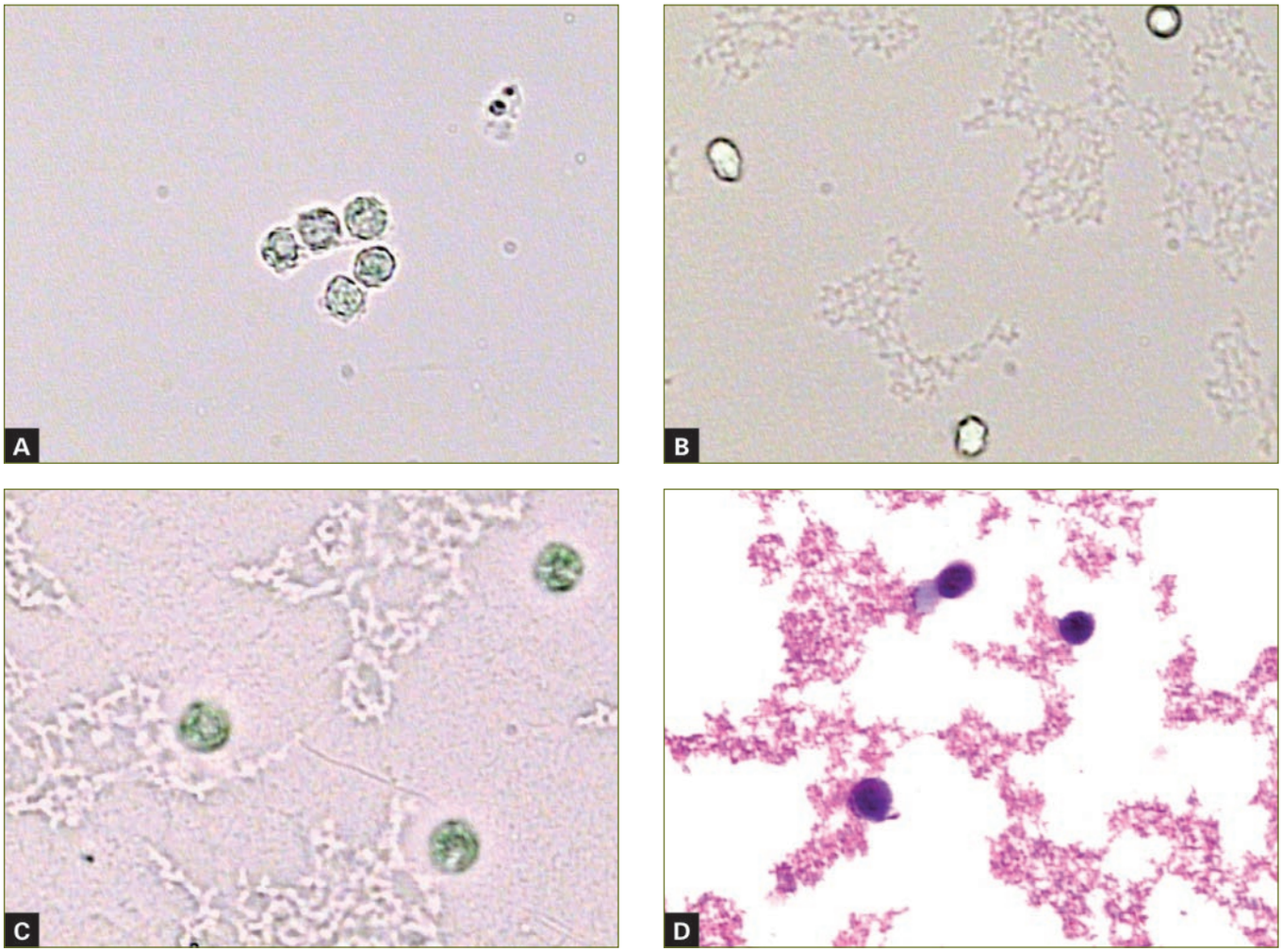


Figura 6.46 (**A** a **D**) Líquido sinovial: formação do precipitado de ácido hialurônico na secagem da lâmina (1.200×). Líquido sinovial na fase líquida sobre a lâmina (**A**); líquido sinovial em fase de secagem demonstrando primeiras formações do precipitado de ácido hialurônico (**B**); material seco sobre a lâmina com formação completa do precipitado de ácido hialurônico (**C**); lâmina corada com May-Grunwald Giemsa exibindo a cor avermelhada do ácido hialurônico precipitado (**D**)

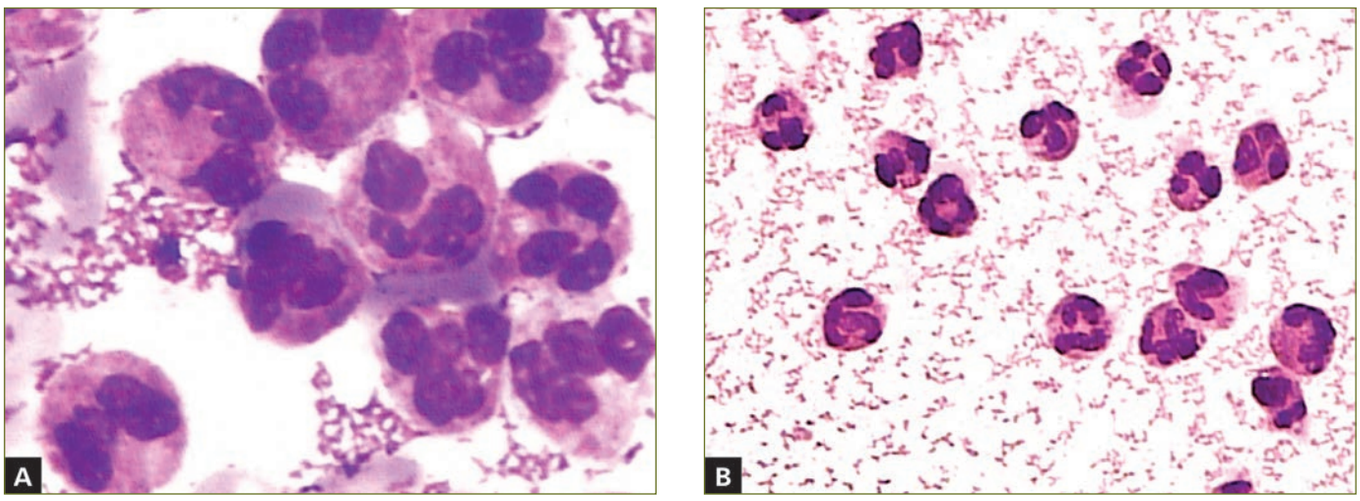
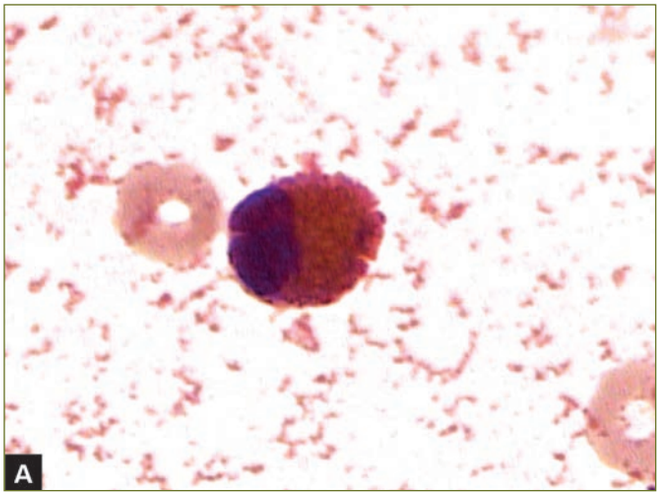


Figura 6.47 (**A** e **B**) Líquido sinovial: contagem de leucócitos superior a 50.000 leucócitos/mm^3 e neutrófilos superiores a 90% (2.000×)



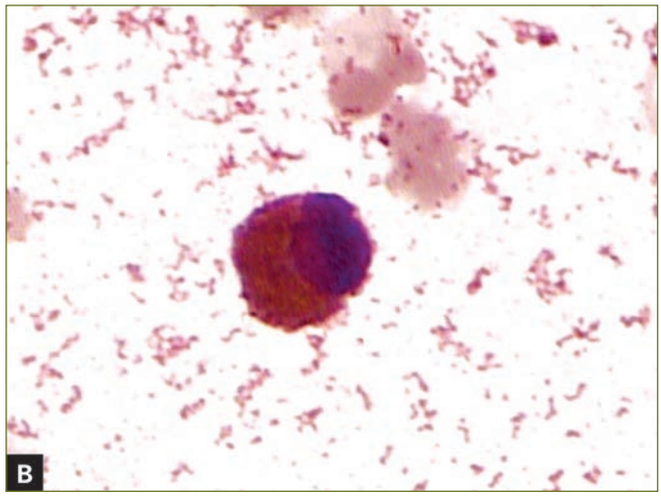
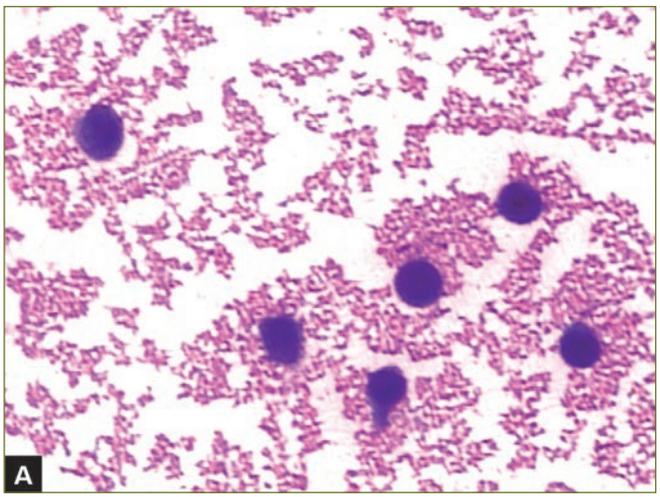


Figura 6.48 (**A** e **B**) Líquido pleural: eosinófilos (2.000×)



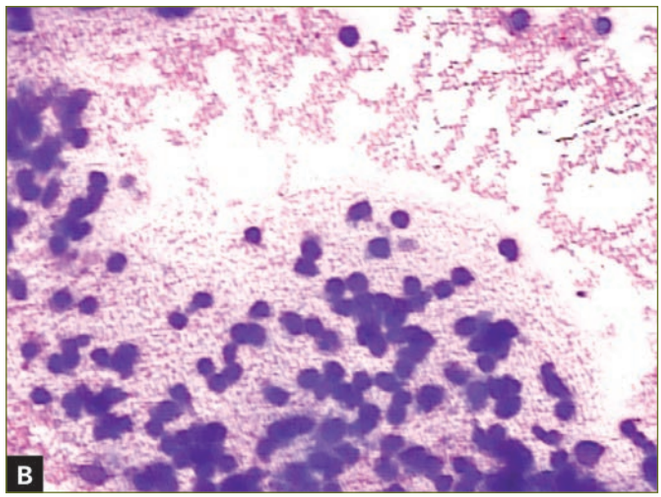


Figura 6.49 (**A** e **B**) Líquido sinovial: predomínio de linfócitos na artrite infecciosa viral (1.200×)

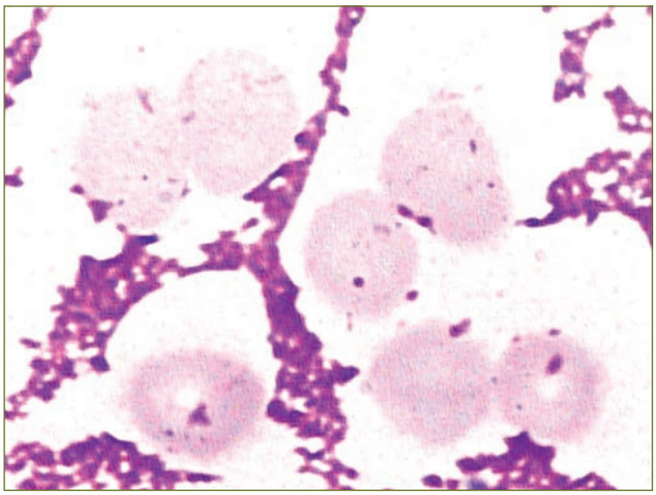


Figura 6.50 Líquido sinovial hemorrágico: presença de numerosas hemácias. Ocorre no traumatismo, na hemofilia ou em outras diáteses hemorrágicas (2.000×)

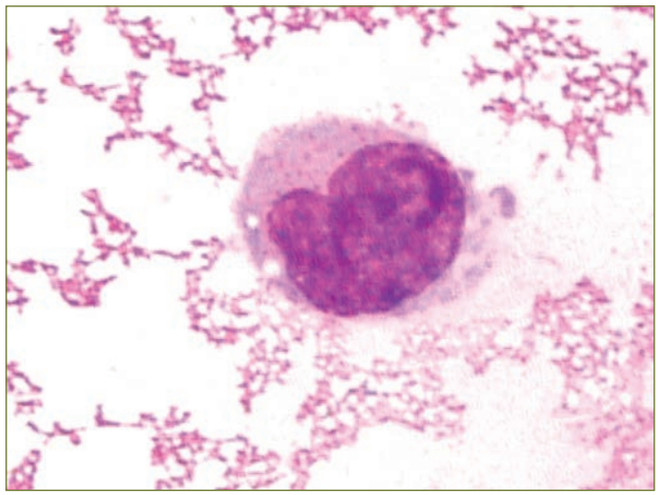


Figura 6.51 Líquido sinovial: monócito (2.000×)

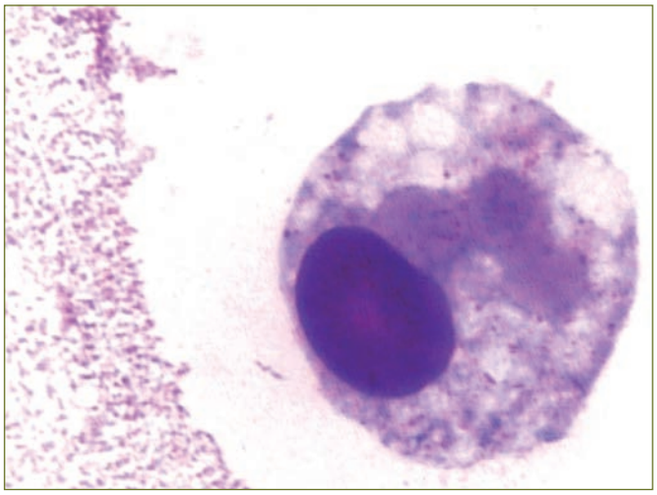
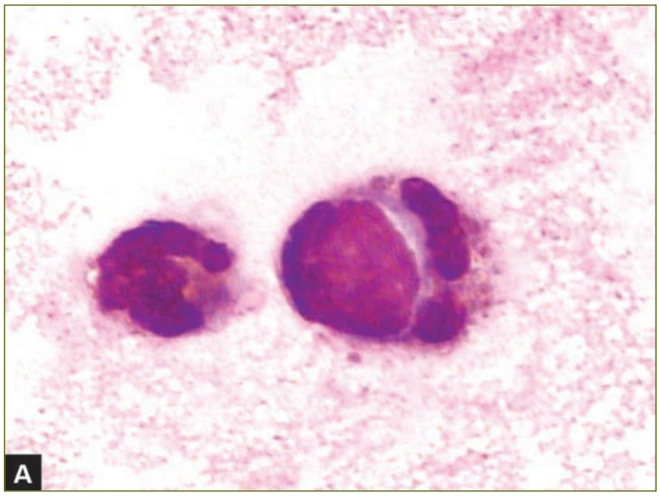


Figura 6.52 Líquido sinovial: macrófago eritrófago (2.000×)



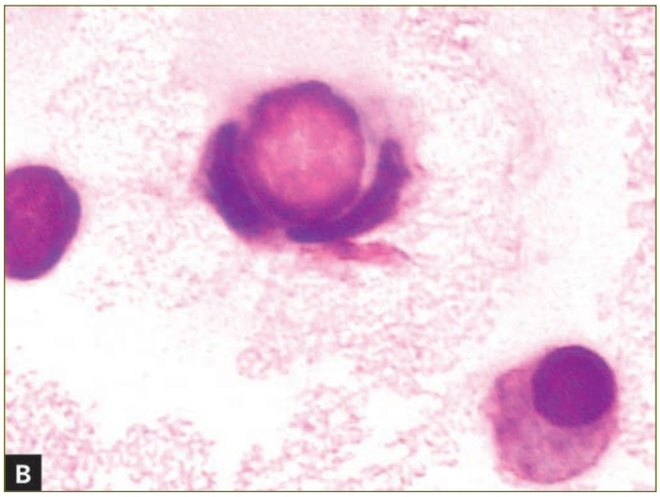


Figura 6.53 (**A** e **B**) Líquido sinovial: células LE (2.000×)

ASPECTO

O aspecto e a cor devem ser observados no lavado/escovado broncoalveolar, principalmente para identificar coágulos e sangue, pois a presença de hemácias indica hemorragia alveolar nas primeiras horas e as hemácias fagocitadas por macrófagos sugerem hemorragia dentro de 48h.

EXAME CITOLÓGICO

A contagem total dos leucócitos do lavado/escovado broncoalveolar pode ser processada em câmara de Neubauer ou em aparelho automatizado, descontadas as células nucleadas que não sejam leucócitos, conforme citado anteriormente em outros líquidos. O preparo das lâminas para a contagem diferencial pode ser feito por citocentrífuga ou por esfregaço.

Na contagem diferencial do lavado/escovado broncoalveolar, são observados macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células epiteliais escamosas e células epiteliais colunares ciliadas brônquicas. Entretanto, elementos fúngicos, inclusões virais e células neoplásicas ocasionalmente podem estar presentes. A contagem celular deve ser realizada dentro de uma hora após a coleta do material, para evitar possíveis alterações morfológicas importantes. Um lavado/escovado broncoalveolar normal contém celularidade total inferior a 2 milhões, mais de 10 macrófagos alveolares por campo, número reduzido de células epiteliais e ausência de exsudato (Figuras 6.54 a 6.60).

Os granulócitos no lavado/escovado broncoalveolar apresentam-se em condições normais em números muito baixos. A contagem de neutrófilos costuma ser inferior a 3% e observa-se seu aumento nos tabagistas, em exposição a toxinas e na broncopneumonia.

TESTE DE HANSEL-SHIMIZU

DEFINIÇÃO

Em 1927, Eyermann relatou uma pesquisa com eosinófilos em esfregaços de mucosa nasal. Já no ano de 1934, Hansel promoveu um grande progresso na citologia nasal publicando um estudo com 5 mil exames, mas em 1977 o método Shimizu modificou a técnica clássica de Hansel e melhorou sua identificação e sua diferenciação celular, criando o teste de Hansel-Shimizu.

O teste de Hansel-Shimizu, ou citologia nasal, baseia-se no estudo e na contagem celular, identificando e quantificando neutrófilos, mastócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos, células epiteliais nasais e células epiteliais colunares ciliadas brônquicas. O teste de Hansel-Shimizu é muito importante no diagnóstico das rinopatias e em sua classificação, podendo também indicar inflamações, processos não inflamatórios, alérgicos, não alérgicos, infecciosos bacterianos, virais e neoplasias. O método utilizado neste teste encontra-se descrita no Capítulo 7, *Técnicas Manuais no Laboratório de Hematologia*.

As rinopatias classificadas pelo teste de Hansel-Shimizu estão descritas nas Figuras 6.61 a 6.64.

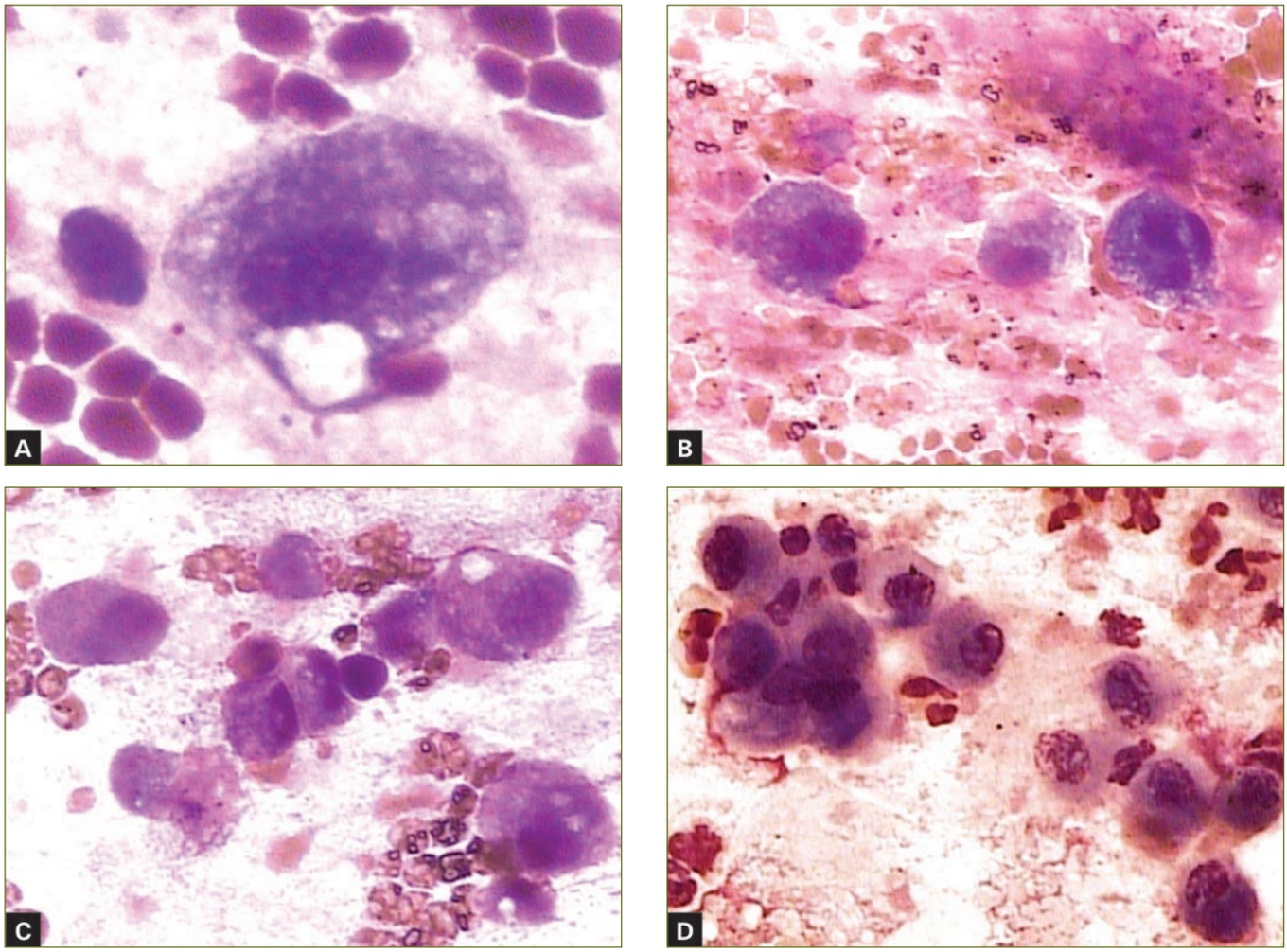


Figura 6.54 (**A** a **D**) Os macrófagos são as células mais frequentes na citologia diferencial do lavado/escovado broncoalveolar. Correspondem de 56% a 80% das células contadas e geralmente se apresentam vacuolizados ou com materiais fagocitados

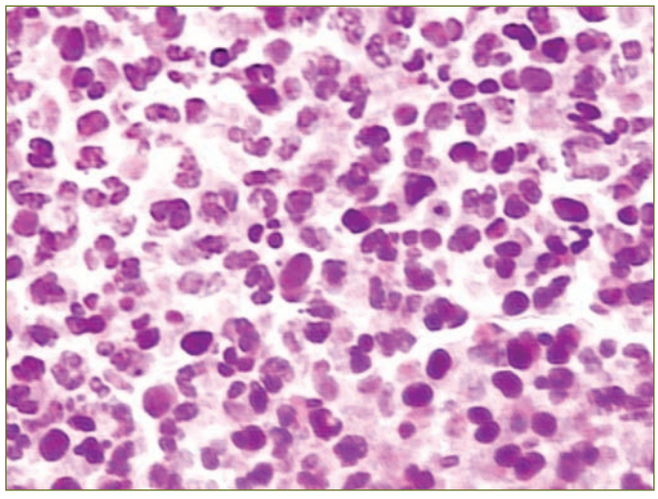


Figura 6.55 Linfócitos. No lavado/escovado broncoalveolar normal, os linfócitos consistem apenas em 1% a 15% do total das células contadas. Observa-se seu aumento nas reações a medicamentos, linfomas pulmonares, doença pulmonar intesticial e infecções não bacterianas

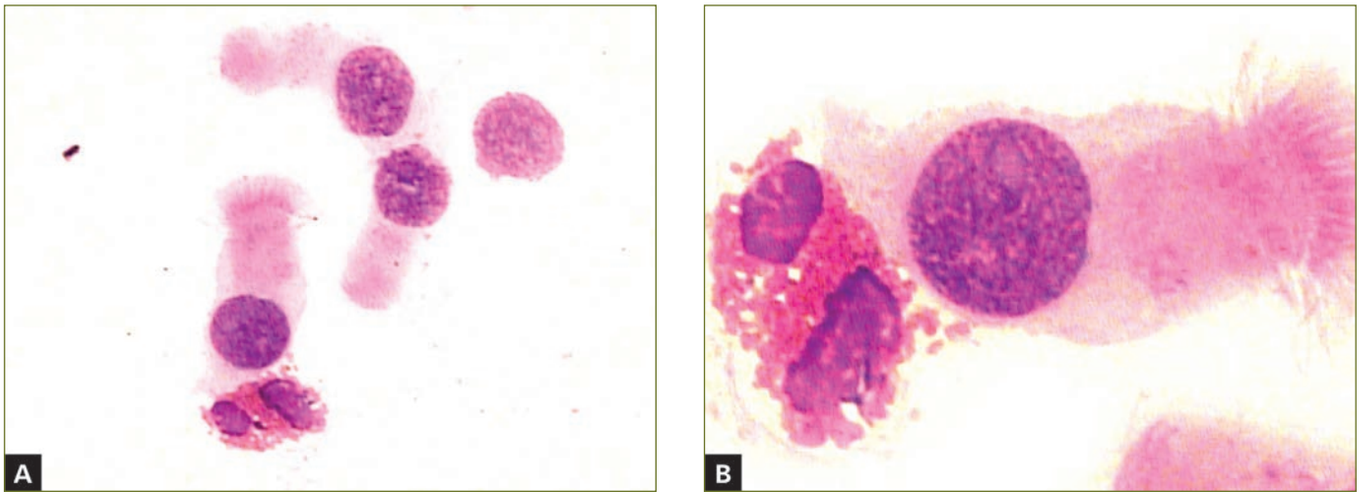


Figura 6.56 (**A** e **B**) Eosinófilos. Em geral, estão ausentes ou em número inferior a 2% do total de células contadas. Os eosinófilos estão elevados em infecções parasitárias, asma, pneumonia eosinofílica e doenças pulmonares induzidas por drogas terapêuticas

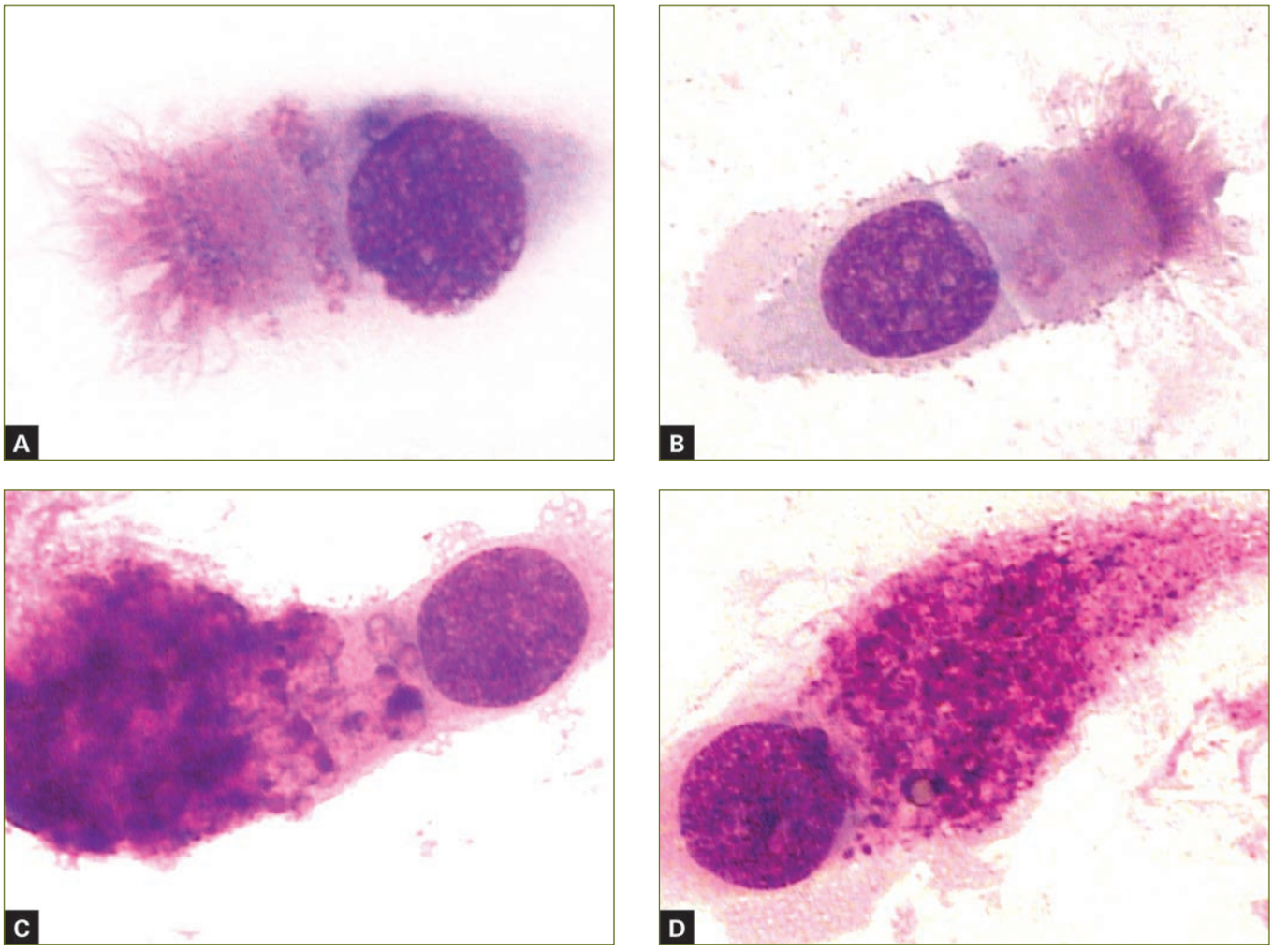


Figura 6.57 (**A** a **D**) Células epiteliais colunares ciliadas brônquicas. Estas células são mais frequentes em escovado do que nos lavados brônquicos. Isso se deve à técnica utilizada no escovado brônquico. Amostras de lavado brônquico normal costumam apresentar de 4% a 17% de células epiteliais colunares ciliadas brônquicas. No escovado brônquico, esse número é sempre maior

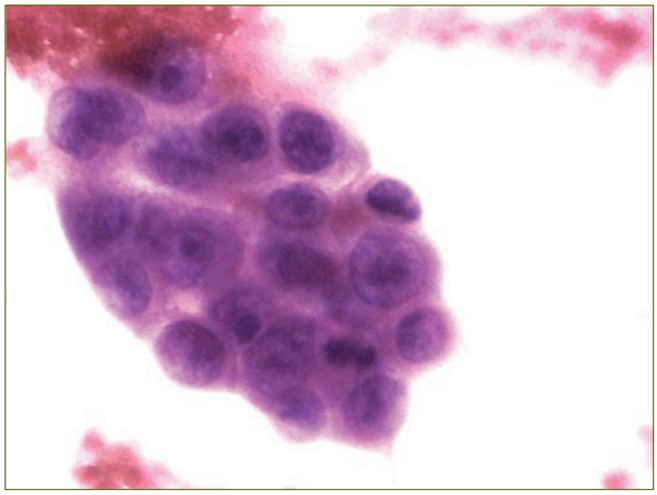


Figura 6.58 Lavado/escovado broncoalveolar: adenocarcinoma moderadamente diferenciado (1.200×)

Fonte: gentilmente cedida pelas Dr^as^ Dayse Lima e Graça Mattos.

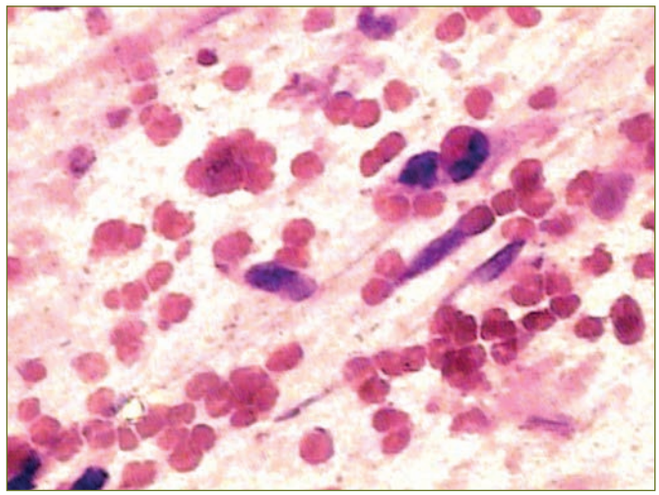


Figura 6.60 Hemácias. A presença de hemácias no lavado/escovado broncoalveolar indica hemorragia alveolar

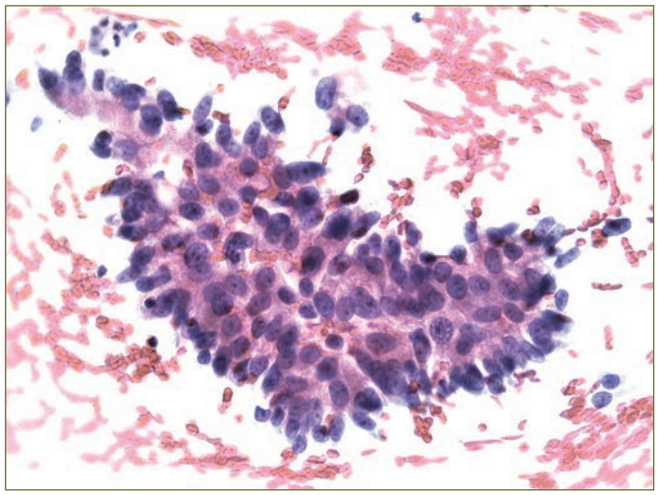


Figura 6.59 Lavado/escovado broncoalveolar: adenocarcinoma bem diferenciado invasivo (1.200×). Células neoplásicas: importante no diagnóstico do carcinoma brônquico, mas também podem ser observadas células neoplásicas metastáticas do pulmão

Fonte: gentilmente cedida pelas Dr^as^ Dayse Lima e Graça Mattos.

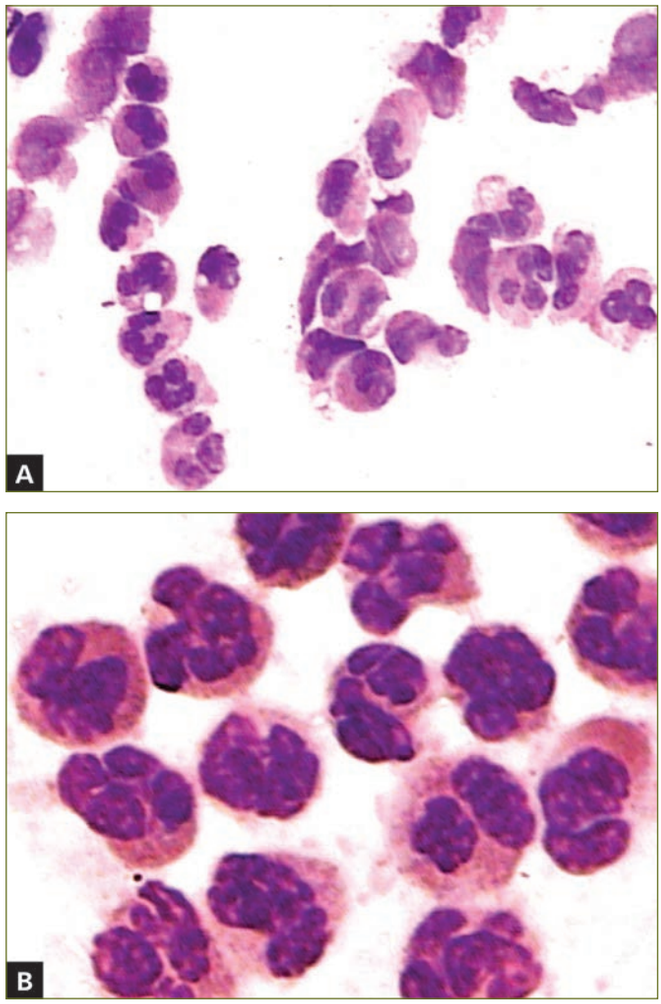


Figura 6.61 (**A** e **B**) Rinopatia infecciosa. Observa-se um predomínio quase absoluto de neutrófilos, com raros ou nenhum eosinófilo e ausência de mastócitos, geralmente associados à presença de germes patogênicos. A cultura é positiva para germes patogênicos

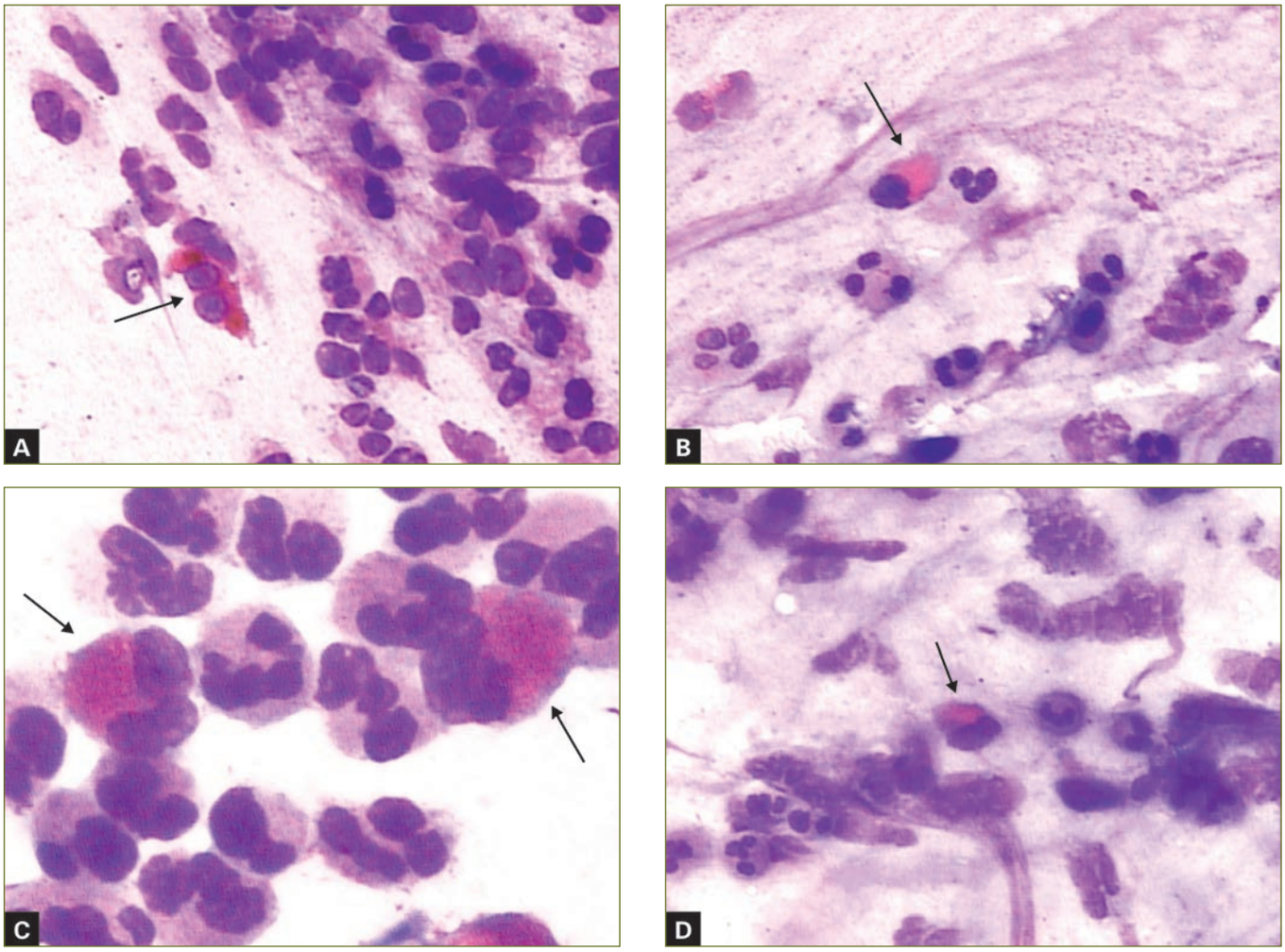


Figura 6.62 (**A** a **D**) Rinopatia mista: a associação das rinopatias infecciosa e alérgica provoca um quadro celular misto, apresentando número elevado de neutrófilos e eosinófilos em pequena quantidade (*setas*). Geralmente, os mastócitos estão ausentes e a cultura é positiva para germes patogênicos

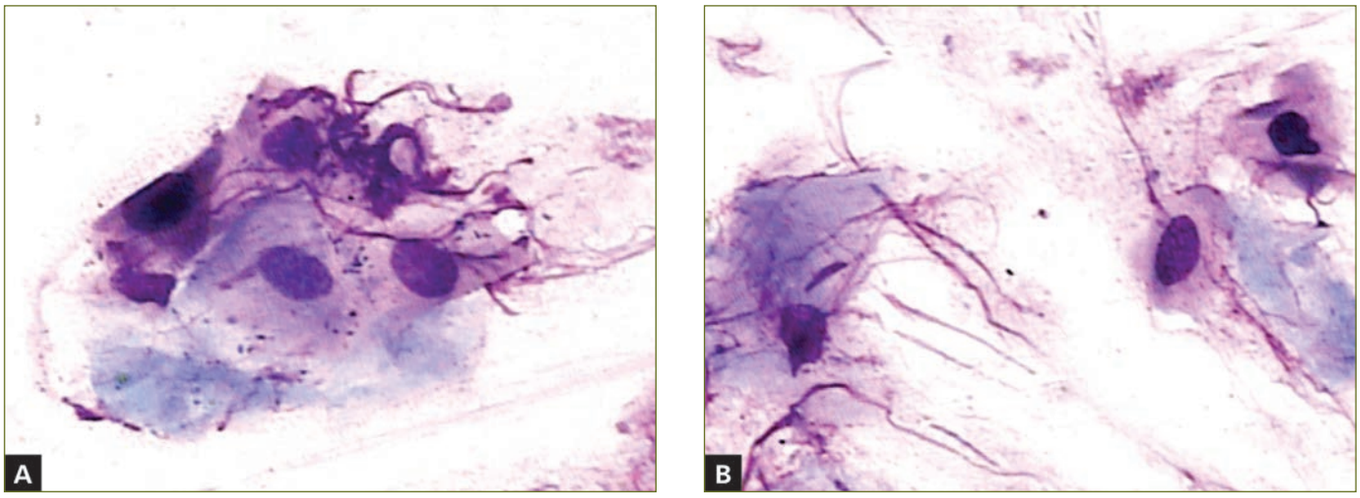


Figura 6.63 (**A** a **D**) Rinopatia vasomotora. A contagem celular é muito pequena e basicamente constituída por células epiteliais nasais e células epiteliais colunares ciliadas brônquicas e alguns filamentos de muco. A cultura é negativa para germes patogênicos

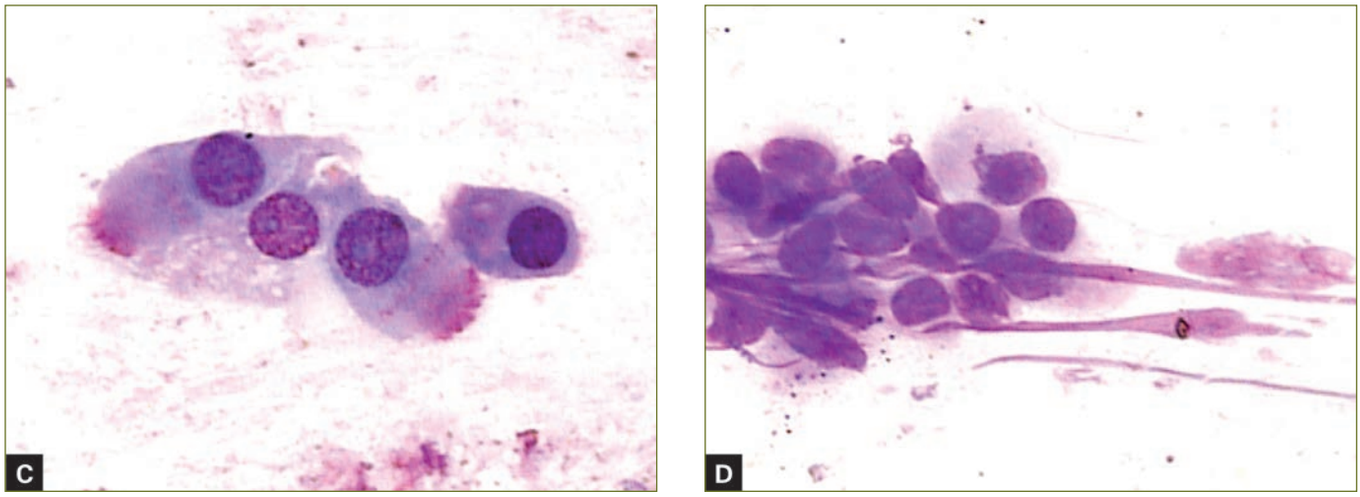


Figura 6.63 (**A** a **D**) (*continuação*) Rinopatia vasomotora. A contagem celular é muito pequena e basicamente constituída por células epiteliais nasais e células epiteliais colunares ciliadas brônquicas e alguns filamentos de muco. A cultura é negativa para germes patogênicos

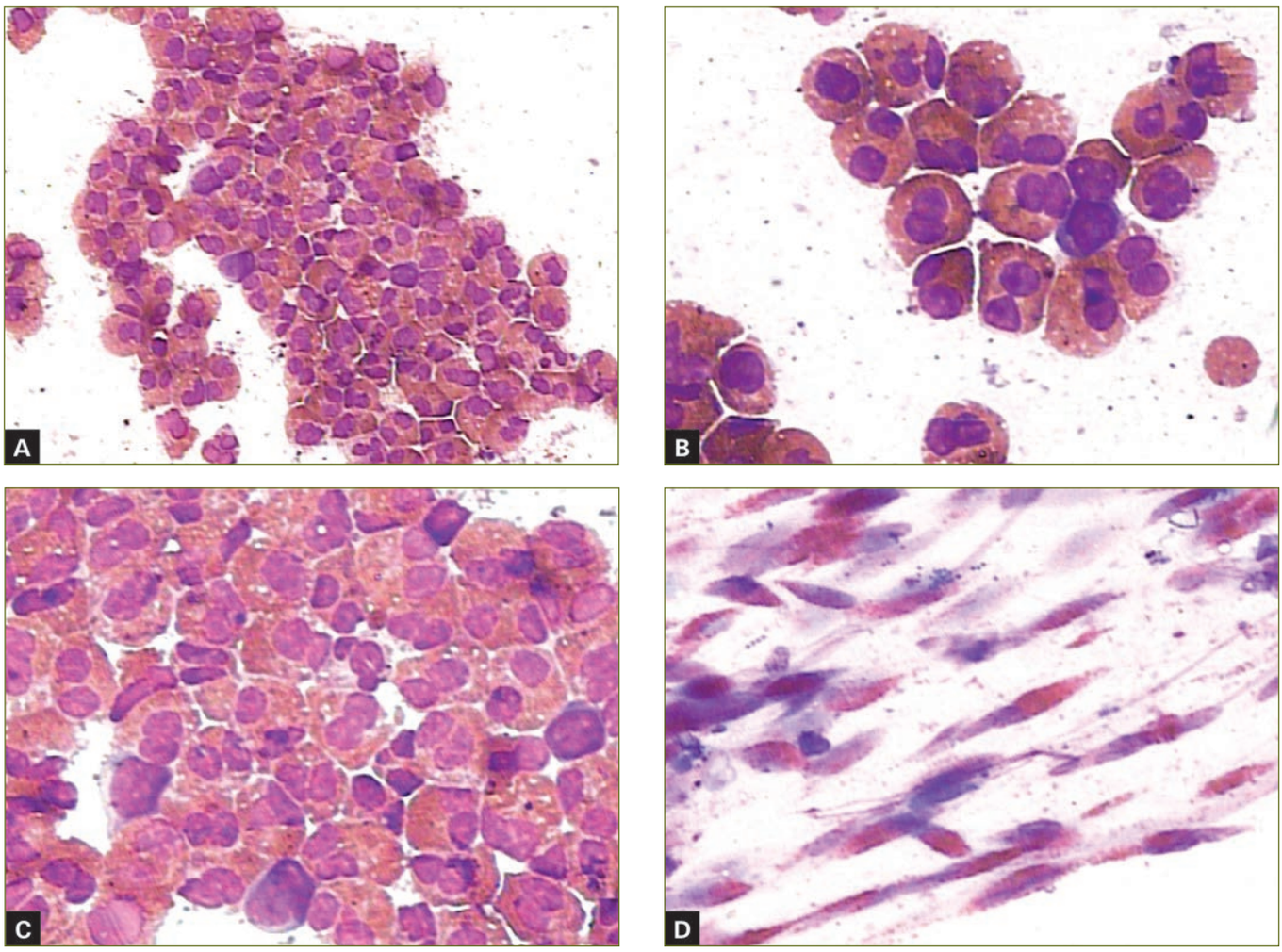


Figura 6.64 (**A** a **D**) Rinopatia alérgica: observa-se o predomínio de eosinófilos, chegando a quase a totalidade celular em alguns casos. Podem ocorrer mastócitos e a cultura é negativa para germes patogênicos

Laboratorio de Hematologia - cap-06.indd 200 24/09/2014 10:23:27

7

Técnicas Manuais no Laboratório de Hematologia

INTRODUÇÃO

Após o avanço tecnológico científico do final do século passado, a maioria dos testes manuais em hematologia foi substituída por técnicas automatizadas em grande parte dos laboratórios clínicos. Entretanto, o conhecimento prático do profissional ou do estudante universitário sobre estes testes é necessário tanto para a validação de novas técnicas automatizadas quanto em pesquisas. Desse modo, este capítulo apresenta as principais técnicas manuais no laboratório de hematologia.

TESTE DE FALCIZAÇÃO DAS HEMÁCIAS

FINALIDADE

O teste de falcização evidencia a presença ou a ausência de Hb S nas hemácias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O princípio é a indução da falcização por meio da desoxigenação da hemoglobina pela substância redutora metabissulfito de sódio em um microambiente fechado, formado pelo espaço entre a lâmina (Figura 7.1) e a lamínula.

PROCEDIMENTO

O procedimento é diluir em 100μL de solução fisiológica com 0,5% de metabissulfito de sódio. Colocam-se 50μL de sangue total com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na lâmina. Homogeneíza-se e cobre-se com a lamínula sem deixar bolha, vedando as bordas da lamínula com esmalte. Em seguida, coloca-se na placa de Petri com gaze umedecida e tampa-se. Realizam-se leituras até 24h. Na presença de hemácias falcizadas, o resultado será positivo (Figura 7.2). Caso não, o resultado será negativo.

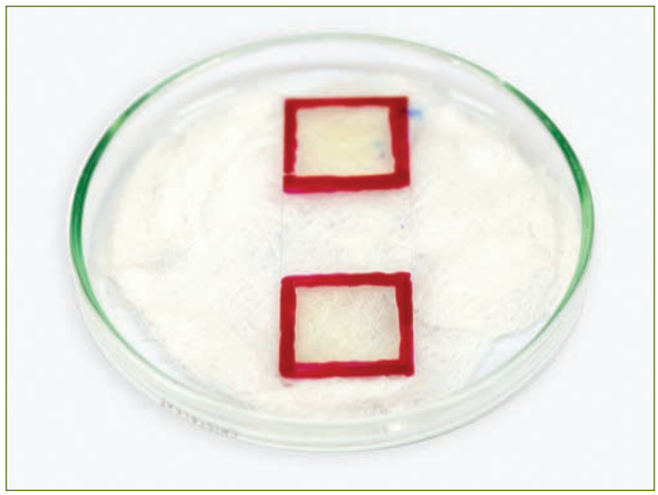


Figura 7.1 Lâmina com as bordas das lamínulas vedadas com esmalte. Dentro, há uma placa de Petri com gaze contendo um pouco de água

CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

FINALIDADE

A finalidade da contagem de reticulócitos é avaliar a eritropoese, investigar anemias hemolíticas e acompanhar a eficácia da resposta à terapia específica.

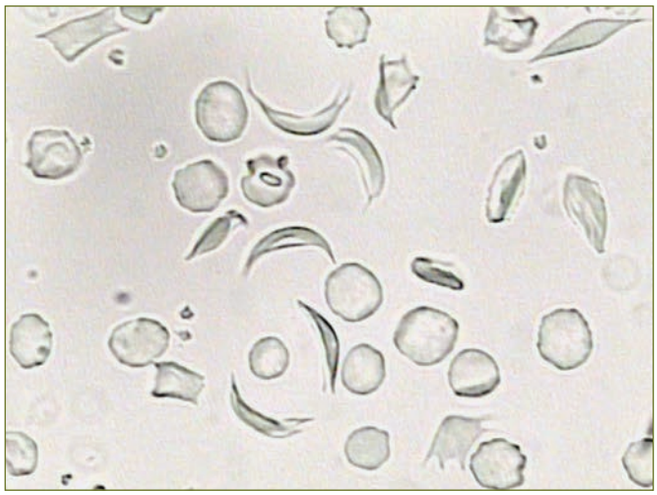


Figura 7.2 Teste de falcização positivo: hemácias falcizadas (2.000×)

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Este método tem por princípio revelar a presença de retículos de RNA ribossomal formados por finos filamentos ou grânulos no interior das hemácias. Eles são observados por meio do corante supravital (azul de cresil brilhante), com base na observação e na contagem microscópica.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Homogeneíza-se a amostra e aspiram-se 50μL do sangue total com EDTA do paciente e 50μL do reagente azul de cresil brilhante. Depois, coloca-se o conteúdo em um tubo de ensaio e homogeneíza-se. Coloca-se o material em banho-maria a 37°C por 15min. Após o término do tempo em banho-maria, homogeneíza-se e faz-se o esfregaço (Figura 7.3). Depois da secagem da lâmina, analisa-se por meio do microscópio óptico. Conta-se a quantidade de reticulócitos (Figura 7.4) em cinco campos de, aproximadamente, 100 hemácias.

Os valores normais: entre 0,5% e 1,5%.

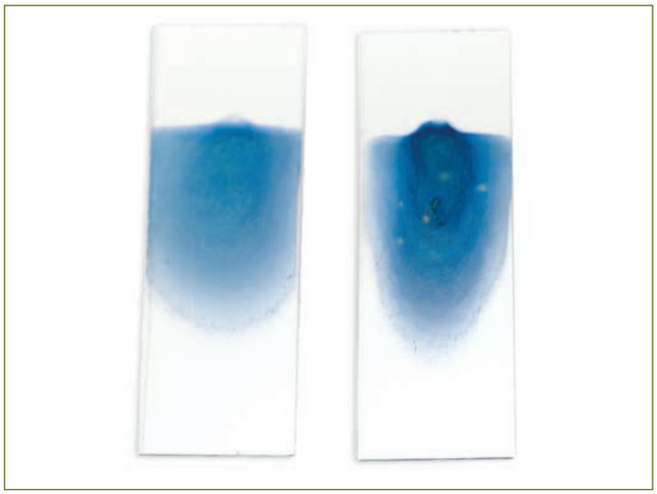


Figura 7.3 Lâmina de reticulócito: cor azulada

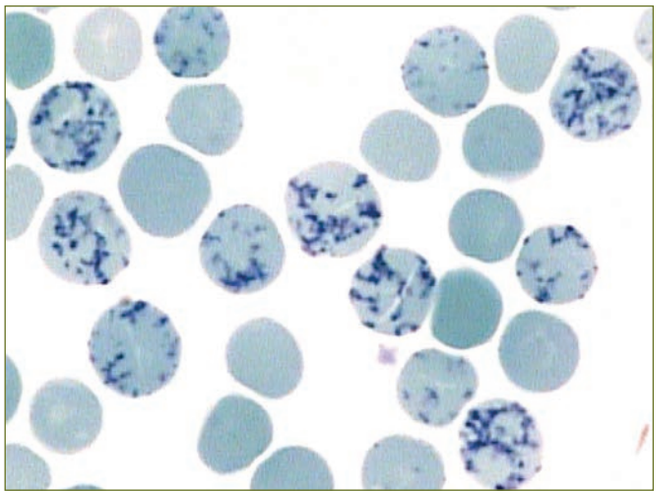


Figura 7.4 Esfregaço com azul de cresil brilhante: paciente com 45% de reticulócitos (2.000×)

PESQUISA DE CORPOS DE HEINZ E AGREGADOS DE HEMOGLOBINA H

FINALIDADE

Os corpos de inclusões de hemoglobina (Hb) H (agregados de cadeia beta em excesso) são observados na alfa talassemia e na forma adquirida da doença da Hb H em pacientes com síndromes mielodisplásicas e mielodisplasia, além daqueles com hemoglobinas instáveis, esplenectomizados e após ingestão ou inalação de alguns produtos químicos. Os corpos de Heinz surgem da desintegração do tetrâmero de hemoglobina, cujos polipeptídios desagregados precipitam-se no interior dos eritrócitos sob a forma de corpos de Heinz. São observados em número aumentado nas anemias hemolíticas, na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), nas hemoglobinopatias por hemoglobinas instáveis, na talassemia maior, nas intoxicações por medicamentos e em pacientes esplenectomizados.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os corpos de Heinz e de Hb H somente são observados após coloração vital (aquosa). Quando submetidos a corantes que usam álcool, como Romanowsky, Giemsa e Wright, os corpúsculos desaparecem por dissolução.

PROCEDIMENTO

Colocam-se 100μL de sangue total com EDTA em um tubo e adicionam-se 100μL de azul de cresil brilhante ou violeta de metila. Incuba-se o material contido no tubo a 37°C por 30min. Depois, é necessário fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio com lente objetiva de imersão. As hemácias positivas para agregados de hemoglobina H (Figuras 7.5 e 7.6) apresentam um padrão "bola de golfe". Os corpos de Heinz (Figura 7.7) apresentam-se em forma de pontos refringentes no interior das hemácias.

Figura 7.5 Agregados de Hb H com o padrão "bola de golfe" (*setas*) (2.000×)

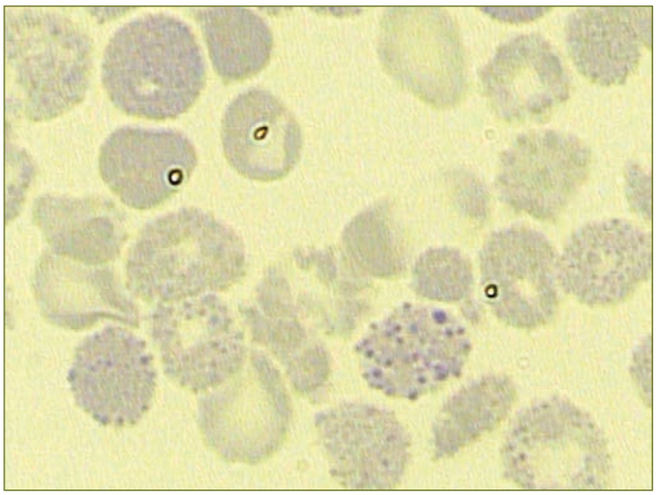


Figura 7.6 Agregados de Hb H com o padrão "bola de golfe" e três hemácias com corpos de Heinz (2.000×)

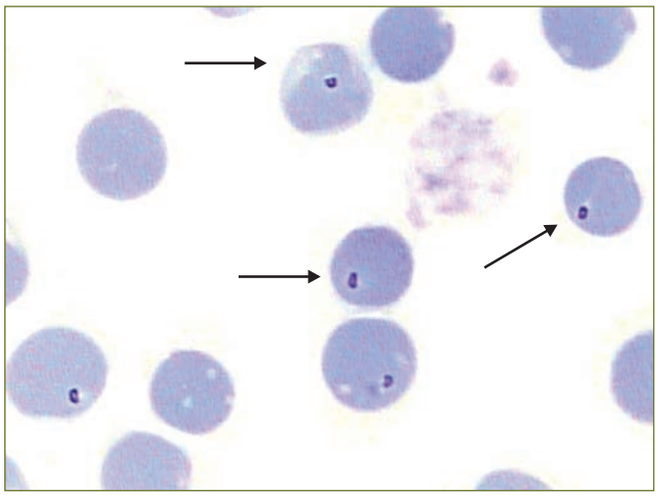


Figura 7.7 Hemácias com corpos de Heinz (*setas*) (2.000×)

COLORAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE HB FETAL

FINALIDADE

A finalidade é evidenciar a presença ou a ausência de Hb fetal nas hemácias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método baseia-se na diferença da capacidade de dissociação das subunidades de Hb A e Hb fetal, em pH abaixo de 4,0. A Hb fetal é ácida, corando-se com eritrosina ou outro similar. Outros tipos de hemoglobinas, por serem eluídas, não fixam o corante.

PROCEDIMENTO

O procedimento consiste em fazer esfregaços finos, obtidos de sangue sem anticoagulante, e fixá-los em etanol a 80% durante 5min. Lava-se com água corrente e deixa-se secar. Depois, colocam-se os esfregaços em solução tampão citrato-fosfato com pH 3,3°C a 37°C por 5min. Lava-se com água corrente e seca-se ao ar. Cora-se com eritrosina por 2min. Lava-se com água e examina-se em microscópio. As hemácias contendo Hb fetal surgem coradas internamente, enquanto as outras permanecem sem coloração interna.

VELOCIDADE DE HEMOSSEDIMENTAÇÃO (VHS), MÉTODO WINTROBE E WESTERGREN

FINALIDADE

A VHS auxilia no diagnóstico e na monitorização de doenças inflamatórias, malignas e do tecido conectivo.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Mede o grau de sedimentação espontânea de glóbulos vermelhos em uma amostra de sangue durante um período específico de tempo. A VHS é um teste muito sensível, porém não específico e costuma ser o primeiro indicador de doença.

PROCEDIMENTOS

Método de Wintrobe

O método de Wintrobe utiliza um tubo com uma escala graduada em milímetros (tubo de Wintrobe), preenchido por meio de um agulhão com amostra de sangue venoso coletado com EDTA ou oxalato de cálcio até a marca zero e colocado em posição vertical por 1h (Figura 7.8). Depois, lê-se diretamente na escala descendente do tubo. Os valores normais diferem-se porque o tubo tem metade do comprimento e graduações distintas do usado no método de Westergren.

Valores normais do VHS (método de Wintrobe)

- **Crianças**: os valores variam de 5 a 15mm/h
- **Mulheres**:
  - *Primeira hora*: até 10mm
  - *Segunda hora*: até 25mm
- **Homens**:
  - *Primeira hora*: até 8mm
  - *Segunda hora*: até 20mm

Método de Westergren

No método Westergren (Figura 7.9), utiliza-se a pipeta de Westergren, graduada de 0 a 200mm, que é preenchida com sangue oxalatado até a marca zero. Fixa-se a pipeta na posição vertical em um suporte próprio e faz-se a leitura da VHS na 1ª e na 2ª hora.

No método de Westergren modificado, o sangue venoso é coletado em EDTA. A seguir, dilui-se o sangue em solução salina a 0,85%, na proporção de 4 partes de sangue para 1 parte de salina. Pode-se, ainda, fazer a diluição em citrato de sódio (3,8%) na proporção de 4:1. Após a diluição do sangue, preenche-se normalmente a pipeta de Westergren. A leitura é feita na primeira e na segunda hora. Neste método, utiliza-se a estante de Westergren.

Valores normais do VHS (método de Westergren)		
	Masculino	**Feminino**
Recém-nascidos	<2mm	<2mm
Adultos	10mm	<20mm
Idosos	<40mm	<50m

Método Micro-VHS

O método Micro-VHS (Figura 7.10) tem maior utilidade em pacientes pediátricos. Nele, utiliza-se um tubo capilar descartável de vidro preenchido com sangue total com EDTA. Coloca-se em posição vertical por 1h e lê-se na tabela de micro-hematócrito em ordem decrescente (Figura 7.11). Os valores de referência se correlacionam bem com os do método de Wintrobe.

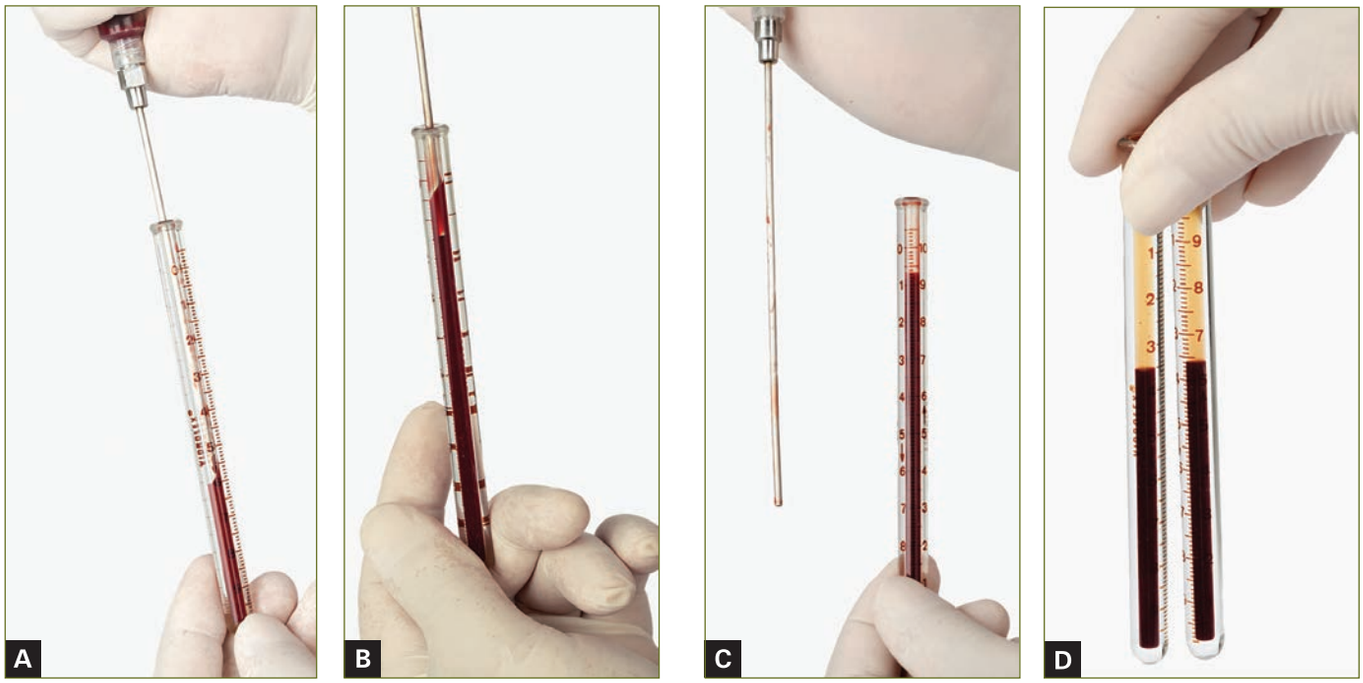


Figura 7.8 (**A** a **D**) VHS: preenchimento do tubo de Wintrobe por meio de um agulhão com amostra de sangue venoso. Observe o resultado da sedimentação espontânea após a primeira hora (*seta*) (**D**)

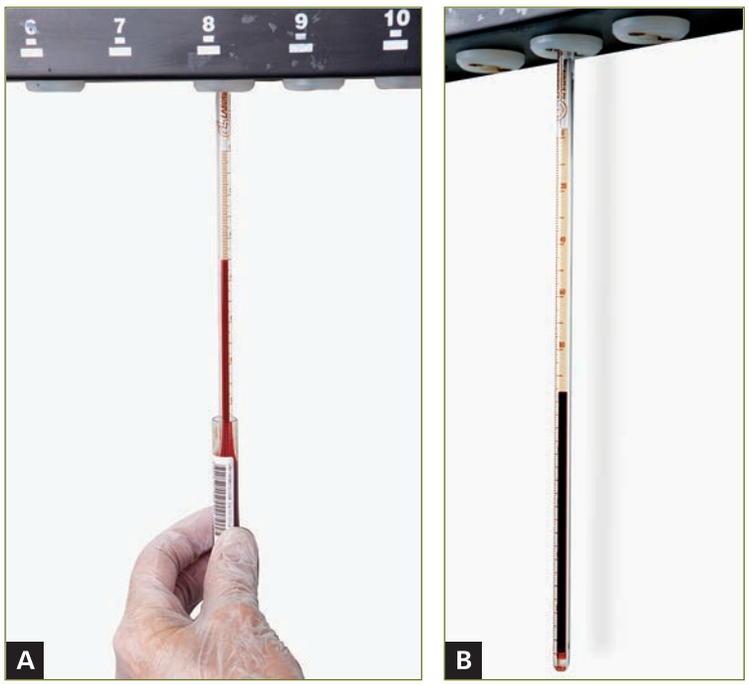


Figura 7.9 (**A** e **B**) VHS na estante de Westergren: O sangue é aspirado pela pipeta de Westergren, e a leitura é feita na 1ª e 2ª hora

Figura 7.10 Método Micro-VHS, com o tubo capilar

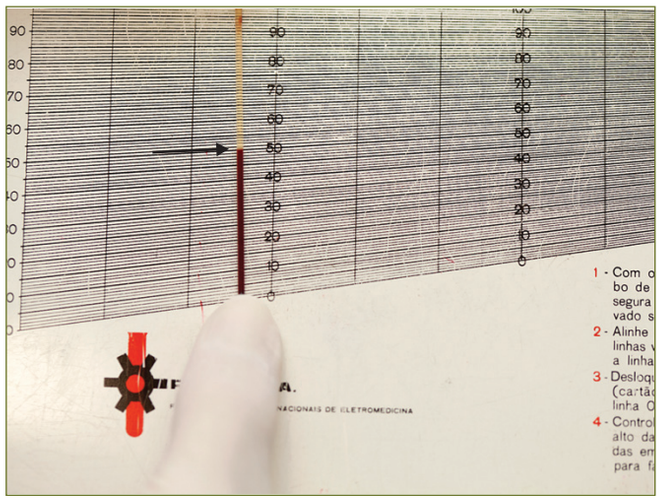


Figura 7.11 O Micro VSH é lido na tabela de micro hematócrito (*seta*) pela quantidade de plasma, de cima para baixo, em ordem decrescente

TESTE DE SOLUBILIDADE EM TUBO E PAPEL FILTRO

FINALIDADE

A finalidade deste teste é detectar hemoglobinopatias com presença de HbS.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método é fundamentado na insolubilidade da HbS no estado reduzido.

PROCEDIMENTO

Colocam-se 2mL da solução redutora e adicionam-se 100µL da papa de hemácias do sangue com EDTA em um tubo de hemólise. Agita-se vigorosamente o tubo e centrifuga-se a 3.000rpm por 5min. Analisa-se o tubo observando a formação de um anel de precipitado de HbS (Figura 7.12). No resultado do papel-filtro quando positivo, ocorre formação de um precipitado de HbS, não absorvido pelo papel (Figura 7.13).

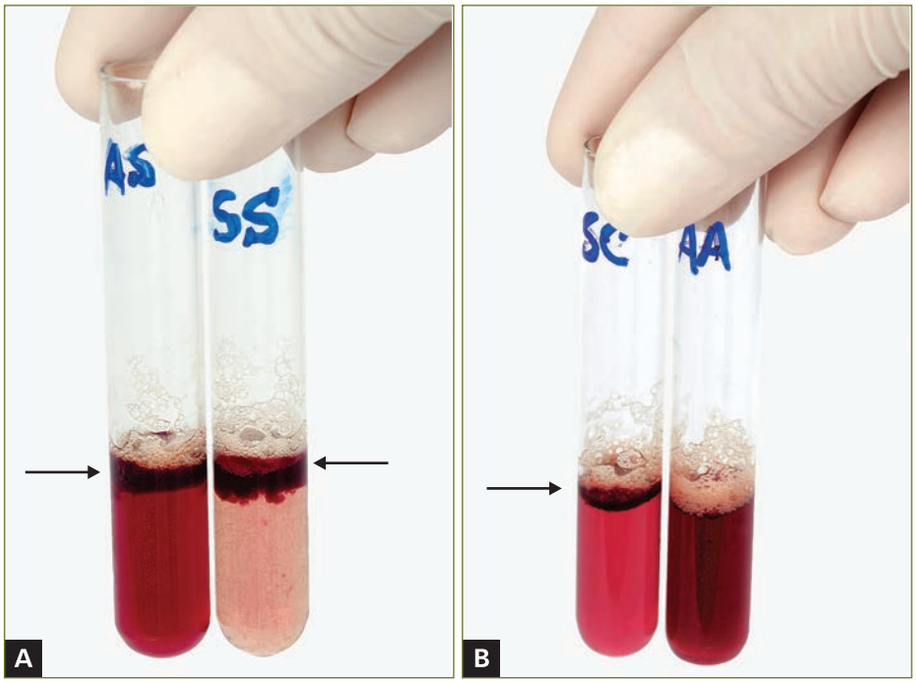


Figura 7.12 (**A** e **B**) Teste de solubilidade em tubo: formação de anel de precipitado de Hb S (*setas*)

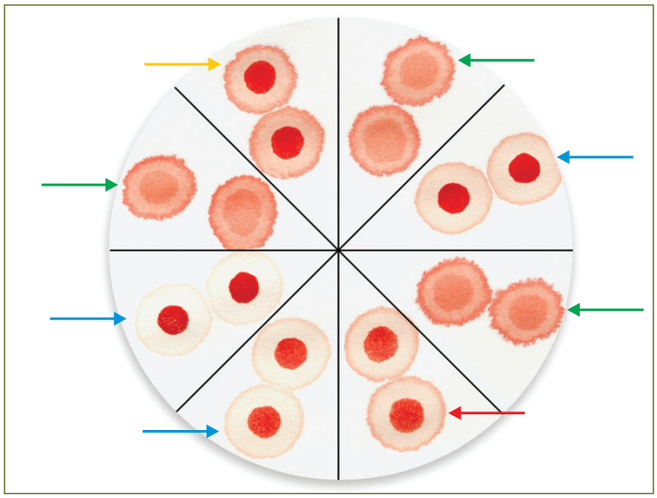


Figura 7.13 Teste de solubilidade em papel-filtro. Quando positivo, ocorre formação de um precipitado de HbS, não absorvido pelo papel-filtro. Por exemplo: HbSS (*setas azuis*), HbSC (*seta vermelha*), HbAA (*setas verdes*) e HbAS (*seta amarela*)

REAGENTES

- **Solução fosfato**:*
  - K_2HPO_4: 29,66g.
  - KH_2PO_4: 16,89g.
  - Saponina P.A. (para análise):1,25g.
  - H_2O destilada q.s.p.: 125mL.
- **$Na_2S_2O_4$ (ditionito de sódio)**.
- **Solução redutora (preparada na hora de ser usada)**:**
  - 2mL de solução fosfato.
  - 20mg de ditionito de sódio.

*Conservar a solução fosfato em geladeira (2°C a 8°C).
**Homogeneizar por inversão até completar a dissolução.

TESTE DE BREWER OU PESQUISA DE DEFICIÊNCIA DE G6PD

FINALIDADE

A finalidade é detectar a presença da meta-hemoglobina que pode ser originada da deficiência de G6PD.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A solução de nitrito transforma a hemoglobina em meta-hemoglobina e esta é reconvertida em hemoglobina na presença de azul de metileno. Quando há uma atividade reduzida de G6PD, a coloração final é castanha (Figura 7.14), pois ocorre a formação de meta-hemoglobina sem reconversão.

PROCEDIMENTO

1. Usam-se três tubos de hemólise rotulados e os tubos-testes:
   - Tubo A1 (padrão normal) = CN (controle negativo).
   - Tubo B1 (padrão positivo) = CP (controle positivo).
   - Tubo C (teste de controle).
   - Tubo do paciente = segue o mesmo procedimento do Tubo C.

   - **Tubo A** = 200μL de sangue venoso coletado com EDTA.
   - **Tubo B** = 200μL do mesmo sangue + 20μL da solução de $NaNO_2$ com 5% de glicose + 10μL de azul de metileno.

2. Homogeneízam-se os três tubos e incubam-se à temperatura de 37°C por 3h.

   Se o paciente for recém-nascido até 6 meses, deve-se incubar por 4h à temperatura de 37°C.

3. Rotular os tubos A, B e C.

   Adicionam-se a cada um desses tubos 5mL de água destilada mais 50μL da alíquota de cada um dos tubos anteriormente preparados, respectivamente, após o período de incubação. Convém homogeneizar por inversão. A leitura macroscópica deve ser feita de imediato por métodos comparativos de cores:

   - **Tubo A**: padrão negativo = vermelho-vivo.
   - **Tubo B**: padrão positivo = castanho.
   - **Tubo C**: teste = cor variável.

TESTE DE HAM

FINALIDADE

Este teste é útil no diagnóstico de hemoglobinúria paroxística noturna.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

As hemácias dos indivíduos com hemoglobinúria paroxística noturna são suscetíveis à lise pelo complemento quando colocadas em soro acidificado. Às vezes, encontra-se um falso resultado positivo na anemia esferocítica. Neste caso, refaz-se o teste usando soro inativado a 56°C por 30min. Na anemia esferocítica, o teste continuará positivo.

PROCEDIMENTO

Desfibrinam-se duas amostras com pérolas de vidro e separam-se as hemácias do soro. Utilizam-se os soros das duas amostras e a papa de hemácias das duas amostras. As hemácias do paciente são incubadas a 37°C em soro acidificado para revelar maior suscetibilidade à hemólise.

Valores normais: ausência de hemólise.

Figura 7.14 Teste de Brewer ou pesquisa de deficiência de G6PD. Na presença de uma atividade reduzida de G6PD, a coloração final é castanha. É observado nos tubos do controle positivo (+) e do paciente 1 (P1) (*setas*)

CURVA DE FRAGILIDADE OSMÓTICA DAS HEMÁCIAS

FINALIDADE

A finalidade da curva de fragilidade osmótica é avaliar anemias hemolíticas, em especial a esferocitose hereditária, a doença hemolítica autoimune e as talassemias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Alterações na forma das hemácias podem alterar a capacidade de resistir a variações de pressão osmótica em suspensão. O grau de fragilidade osmótica das hemácias reflete sua habilidade de resistir a soluções hipotônicas crescentes.

PROCEDIMENTO

O sangue é diluído em solução salina hipotônica tamponada em pH 7,4 com fosfatos. Coloca-se uma alíquota de sangue em contato com diferentes concentrações de solução de cloreto de sódio. Deixa-se em temperatura ambiente por 20 a 30min. Em soluções de baixa concentração osmótica, a água penetra nas células, causando tumefação e hemólise. O resultado é dado em porcentagem de hemólise, por meio de cálculo específico, utilizando as densidades ópticas obtidas com as leituras. Tais valores são transferidos para um gráfico, formando uma curva, em que já se encontram as curvas-controle.

Valores normais: defeitos na hemoglobina costumam apresentar aumento da resistência osmótica.

PESQUISA DE ACANTÓCITOS

FINALIDADE

A pesquisa de acantócitos (Figura 7.15) serve para identificar a deficiência congênita de betalipoproteínas. Os pacientes com esta deficiência também apresentam graves perturbações neurológicas.

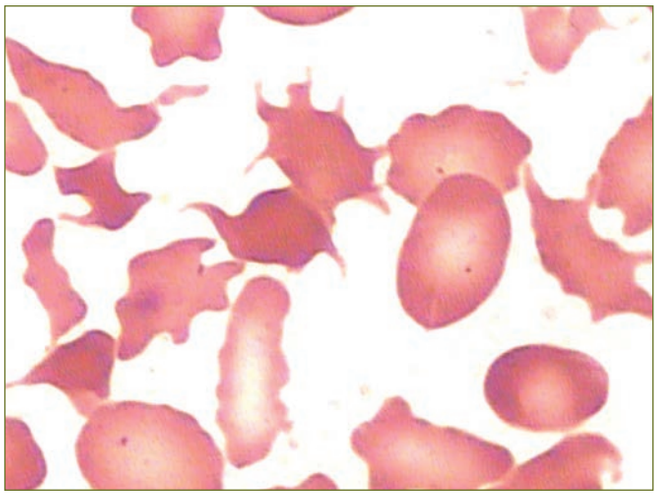


Figura 7.15 Acantócitos (2.000×).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método objetiva identificar hemácias espiculadas e irregulares em esfregaço de sangue total sem EDTA.

PROCEDIMENTO

O procedimento consiste na pesquisa de acantócitos em esfregaços de sangue total sem EDTA.

Valores normais: ausência de acantócitos.

PESQUISA DE SIDERÓCITOS OU CORPÚSCULOS DE PAPPENHEIMER – COLORAÇÃO DE PERLS

FINALIDADE

Por meio da coloração de Perls, a pesquisa serve para identificar agregados de ferritina no interior das hemácias (siderócitos ou corpúsculos de Pappenheimer) (Figura 7.16) e eritroblastos (sideroblastos em anel), provocados por distúrbio no metabolismo do ferro. Estes são observados na anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), talassemias e após esplenectomia.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A reação entre o ferrocianeto ácido da coloração de Perls e o íon férrico da hemossiderina forma o ferrocianureto férrico que se cora de azul intenso (azul da Prússia). Esta reação é mais utilizada em material da medula óssea para evidenciar sideroblastos em anel, mas pode ser usada em material de sangue periférico. Em geral, a coloração de Perls é utilizada em pacientes com idade superior a 40 anos e que apresentam uma ou mais citopenias associadas à anemia. A pesquisa de corpúsculos de Pappenheimer, que são pequenos grânulos azuis (hemossiderina) no sangue periférico, é feita com o corante de Romanowsky.

PROCEDIMENTO

O procedimento consiste em submeter as lâminas à solução de clorídrico-ferrocianeto por 1h. Depois, lava-se em água destilada por 3 vezes e contracorar pela safranina durante 2min. Por fim, lava-se em água para diferenciar (controle ao microscópio), desidrata-se e monta-se.

Valor de referência: pigmento férrico azul.

CONTAGEM TOTAL DE HEMÁCIAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

FINALIDADE

Esta contagem tem por finalidade determinar o número de hemácias no sangue por milímetros cúbicos. É utilizado no diagnóstico e na monitoração de anemias e eritrocitoses.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na contagem de hemácias pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer (Figura 7.17).

PROCEDIMENTO

Deve-se pipetar 3,8mL de solução de Hayen (diluidor isotônico) e 20µL de sangue total em um tubo de ensaio. Convém colocar a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preencher com o sangue diluído. Contam-se as hemácias dos cinco quadrados utilizando a objetiva microscópica de 10×. Multiplica-se o número de hemácias encontradas nos cinco quadrados por 10.000. O resultado é dado em milímetros cúbicos.

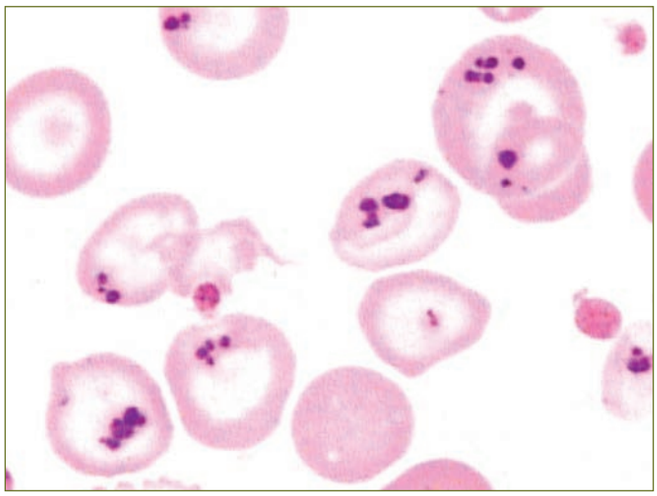


Figura 7.16 Corpúsculos de Pappenheimer (2.000×)

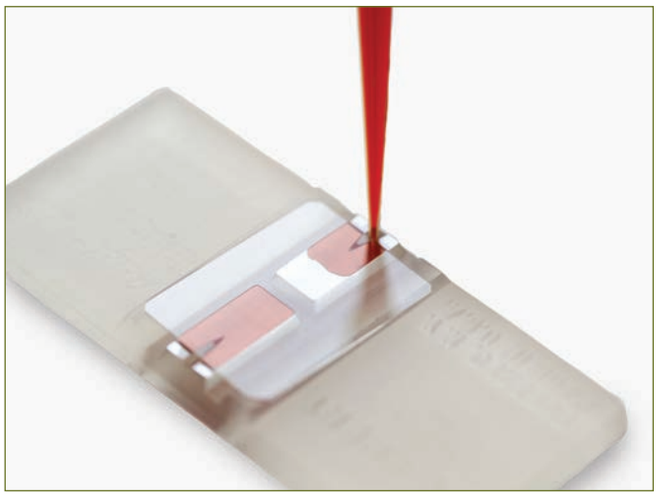


Figura 7.17 Contagem de hemácias em câmara de Neubauer: aplicação das hemácias diluídas nos retículos da câmara

Valores de referência:

- **Homens**: 4,5 a 5,5 milhões/mm^3.
- **Mulheres**: 4,0 a 5,0 milhões/mm^3.
- **Recém-nascidos**: 5,5 a 7,0 milhões/mm^3.

A contagem de hemácias em câmara de Neubauer oferece grande possibilidade de erros e dispêndio de tempo. Portanto, sempre que possível, é preferível a contagem em aparelhos automatizados.

Valores de referência:

- **Homens**: 4,5 a 5,5 milhões/mm^3.
- **Mulheres**: 4,0 a 5,0 milhões/mm^3.
- **Recém-nascidos**: 5,5 a 7,0 milhões/mm^3.

- **Solução diluente**:
  - *Citrato de sódio*: 3,8g.
  - *Formol a 40%*: 2,0mL.
  - Água destilada *q.s.p*: 100,0mL.

ELETROFORESE DAS HEMOGLOBINAS

FINALIDADE

A eletroforese tem como finalidade o diagnóstico diferencial das hemoglobinopatias e talassemias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A metodologia consiste na migração de hemoglobinas por diferença de cargas elétricas em acetato de celulose, gel de agarose ou gel poliacrilamida (Figura 7.18). O estudo inclui a eletroforese em tampão de pH alcalino e ácido.

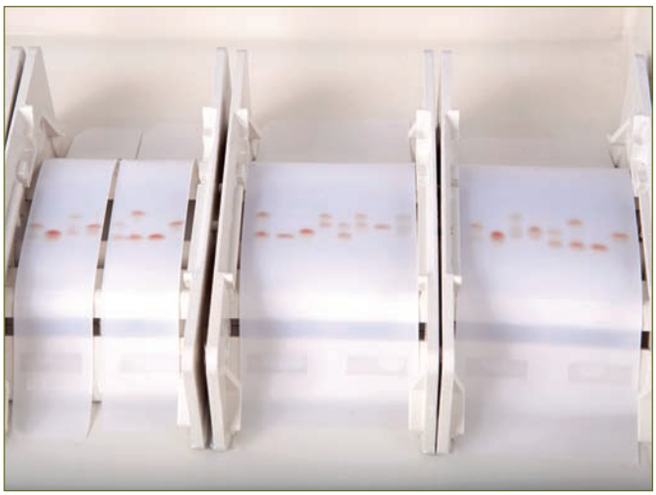


Figura 7.18 Cuba de eletroforese com solução tampão e folhas de acetato de celulose com várias corridas de hemoglobina

PROCEDIMENTO

Centrifuga-se 1mL de sangue com anticoagulante a 1.500rpm, durante 5min. Remove-se o plasma e lavam-se as hemácias por três vezes com solução salina a 0,85%. Centrifuga-se outra vez nas mesmas condições e despreza-se o sobrenadante. Adiciona-se outra parte de água destilada, homogeneíza-se e, a seguir, acrescenta-se um volume de clorofórmio ou saponina, igual ao do hemolisado formado. Agita-se vigorosamente e centrifuga-se a 2.000rpm por 15min. A solução de hemoglobina sobrenadante ou hemolisado é retirada e transferida para outro frasco limpo. Utiliza-se o material hemolisado após 5min e até 24h após a preparação. Aplica-se levemente a amostra do hemolisado sobre a folha de acetato de celulose a 2cm do compartimento do polo negativo e espera-se 30min para encerramento e leitura da corrida (Figura 7.19) (fracionamento das hemoglobinas). Durante os 5 primeiros minutos, convém observar a presença ou não de HbH.

Cuba de eletroforese e solução tampão

Adequa-se a quantidade de solução tampão em cada compartimento da cuba de eletroforese. Coloca-se o acetato de celulose em solução tampão, pelo menos durante 15min antes de começar a eletroforese. Remove-se o excesso de solução tampão com papel absorvente. Esticam-se e ajustam-se as folhas de acetato de celulose na cuba de eletroforese antes da aplicação do hemolisado.

Reativo hemolisante

- **Saponina P.A.**: 1g.
- **Água destilada**: 100mL.

Reagentes

- Solução tampão: TEB pH 8,5 = Tris-EDTA-borato pH 8,5 (0,025M).
- Tris-hidroximetil-aminometano: 10,2g.
- EDTA: 0,6g.
- Ácido bórico: 3,2g.
- Água destilada q.s.p.: 1.000mL.

Valores normais:

- **Adulto**:
  - Hb: 96% a 98%.
  - Hb A2: 2,5 a 3,6%.
  - Hb F: até 1%.

CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS EM CÂMARA DE NEUBAUER

FINALIDADE

Esta contagem tem por finalidade a determinação do número de leucócitos no sangue periférico por milímetros cúbicos. É utilizada no diagnóstico e na monitoração de leucopenias e leucocitoses.

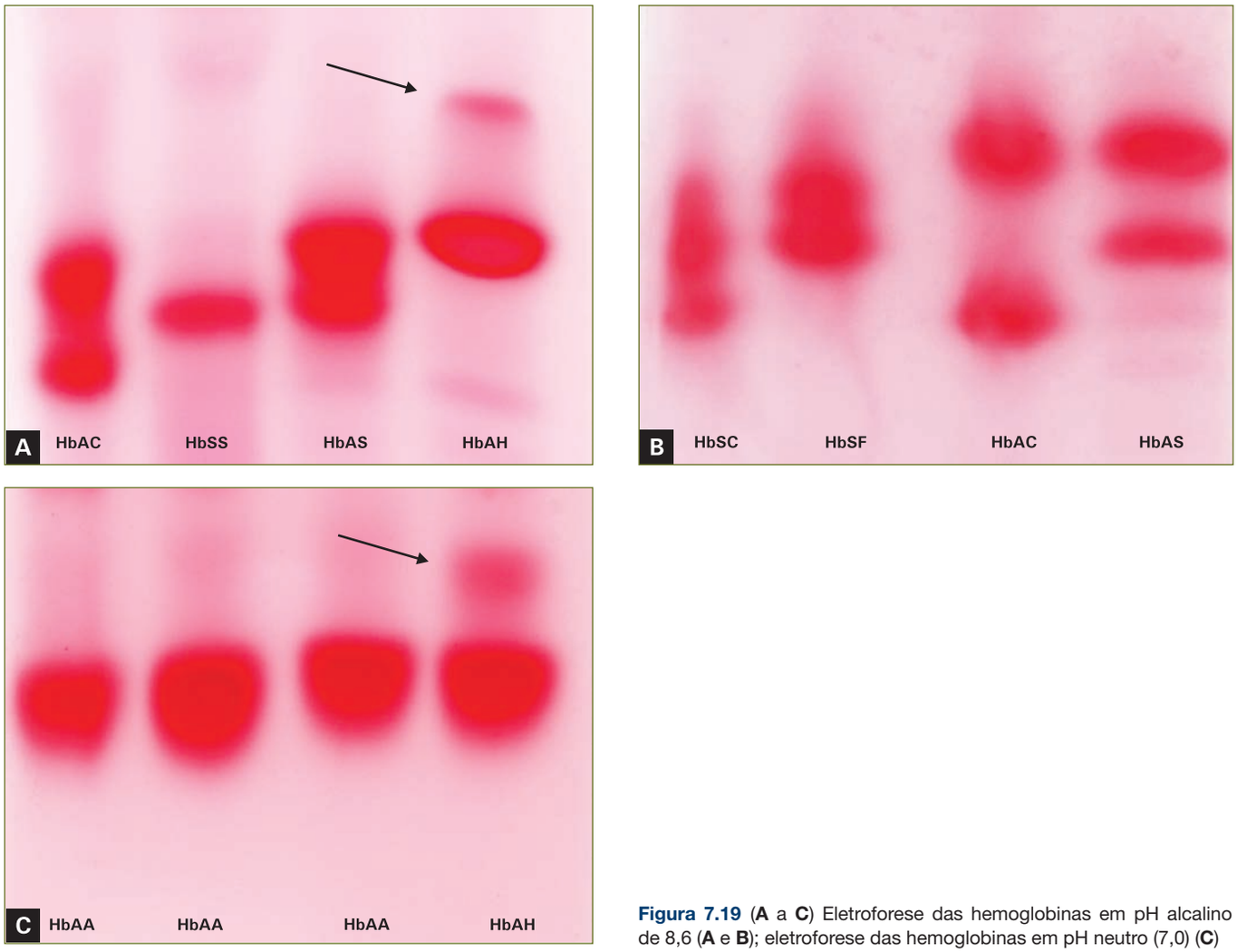


Figura 7.19 (**A** a **C**) Eletroforese das hemoglobinas em pH alcalino de 8,6 (**A** e **B**); eletroforese das hemoglobinas em pH neutro (7,0) (**C**)

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na contagem de leucócitos pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer.

PROCEDIMENTO

Colocam-se 380µL do líquido de Türk (solução de ácido acético 2%) em um tubo de ensaio e adicionam-se 20µL de sangue total com EDTA. Homogeneiza-se o tubo de ensaio e, com uma pipeta, enchem-se os retículos da câmara de Neubauer (Figura 7.20), evitando excesso de líquido e bolhas de ar sob a lamínula (Figuras 7.21 a 23). Convém contar as células nos quatro quadrados grandes laterais. Ao final, somam-se os valores encontrados nos quatro quadrados e divide-se por 4. O resultado deve ser multiplicado por 20, que foi a diluição usada, e depois novamente multiplicado por 10. Nesse, observa-se o número de células em 0,1mm^3; por isso, corrige-se para 1mm^3.

Valores normais em adultos: entre 5.000 e 10.000 células/mm^3.

A contagem em câmara de Neubauer de leucócitos oferece grande possibilidade de erros e dispêndio de tempo. Portanto, sempre que possível, é preferível a contagem em aparelhos automatizados.

CONTAGEM DE PLAQUETAS PELO MÉTODO DE FÔNIO

FINALIDADE

Esta contagem tem por finalidade avaliar a trombopoese e a hemostasia primária, além de diagnosticar e monitorar púrpuras e trombocitoses (Figuras 7.24 e 7.25).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método de Fônio consiste em contar as plaquetas existentes em cinco campos do esfregaço, que devem conter aproximadamente 200 hemácias cada campo. Logo, faz-se regra de três, relacionando o número de plaquetas contadas, o de hemácias contadas e o de hemácias por milímetro cúbico de sangue.

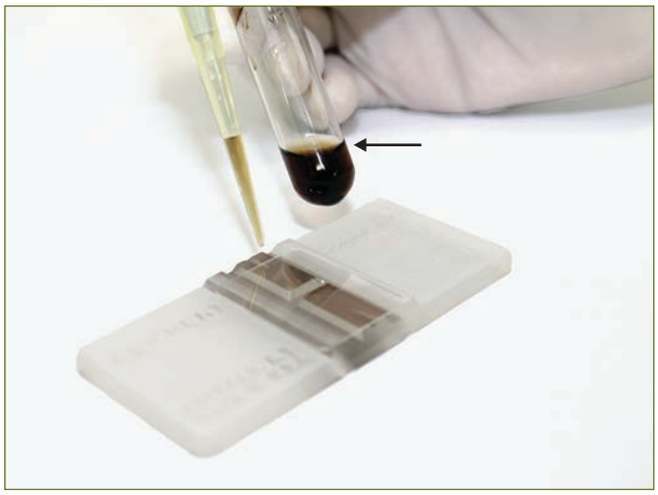


Figura 7.20 Contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Pipeta preenchendo os retículos da câmara de Neubauer com sangue diluído em líquido de Türk (*seta*)

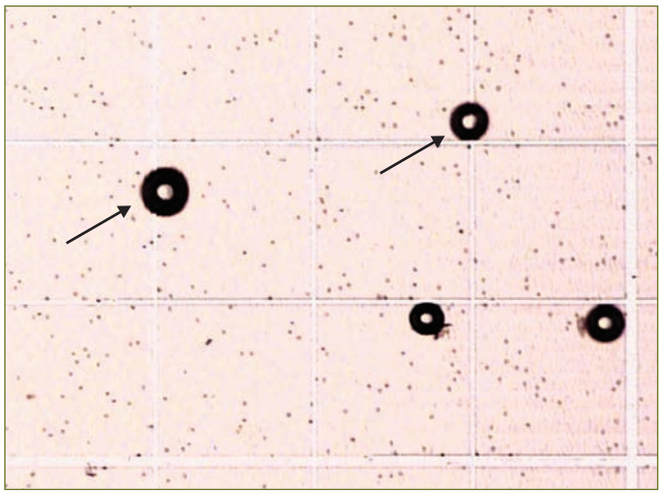


Figura 7.23 Bolhas de ar na câmara de Neubauer (*setas*) (800×)

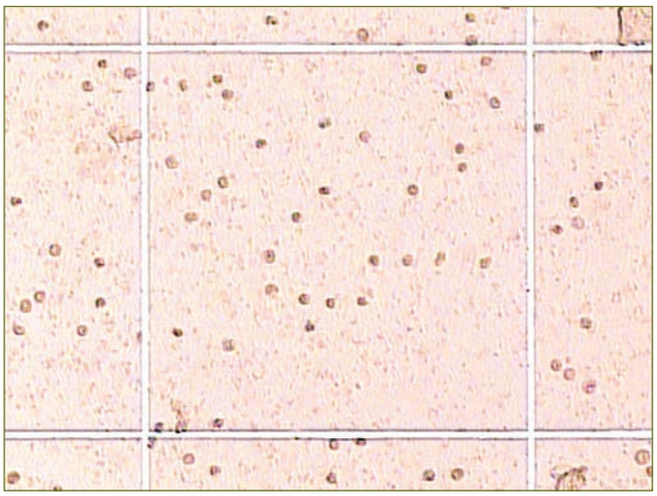


Figura 7.21 Leucócitos na câmara de Neubauer (1.200×)

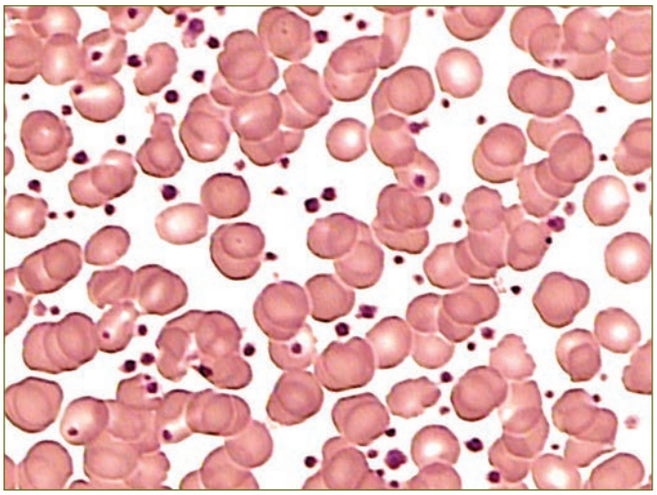


Figura 7.24 Plaquetose: paciente com 1.150.000 células/mm^3 (1.200×)

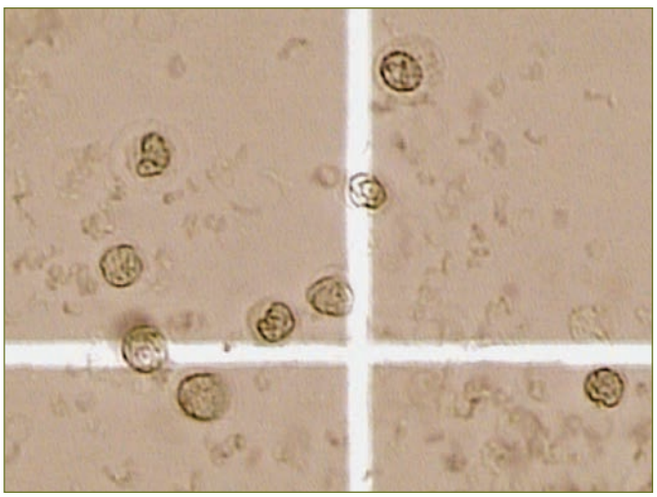


Figura 7.22 Leucócitos na câmara de Neubauer (2.000×)

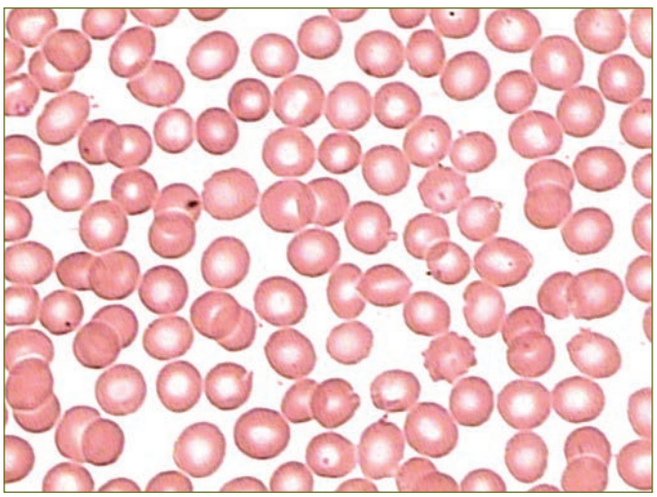


Figura 7.25 Plaquetopenia: paciente com 5.000 células/mm^3 (2.000×)

PROCEDIMENTO

Por meio da lâmina de esfregaço preparada na coleta, realiza-se a coloração pelo método de May-Grunwald-Giemsa. Seca-se e examina-se por imersão. Contam-se 1.000 hemácias e, ao mesmo tempo, as plaquetas encontradas. A contagem é feita em cinco campos sucessivos, seguindo linhas longitudinais em relação à lâmina.

Valores normais:

- 150.000 a 450.000 células/mm^3.

Cálculos: regra de três

$$\frac{\text{Número de plaquetas contadas} \times \text{Número de eritrócitos contados}}{X \qquad \text{Contagem total de eritrócitos/mm}^3}$$

CONTAGEM DE PLAQUETAS PELO MÉTODO DE BRECHER

FINALIDADE

Esta contagem tem por finalidade avaliar a trombopoese e a hemostasia primária, além de diagnosticar e monitorar púrpuras e trombocitoses.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na contagem de plaquetas em câmara de Neubauer.

PROCEDIMENTO

Prepara-se a diluição de 1/200 colocando-se 10µL de sangue com EDTA em 2mL de líquido diluidor de Brecher. Preenche-se a câmara de Neubauer e, após 3min, realiza-se a contagem. O cálculo é feito multiplicando-se o número de plaquetas contadas por 2,0 em diluição de 1/200. Desse modo, consegue-se o número de plaquetas por mm^3. A contagem em câmara de Neubauer de plaquetas oferece uma grande possibilidade de erros e dispêndio de tempo. Portanto, sempre que possível, é preferível a contagem em aparelhos automatizados.

Líquido diluidor de Brecher

- **Azul de metileno 1%**: 2 gotas.
- **Oxalato de amônia**: 1,0g.
- **Água destilada q.s.p.**: 100mL.

PESQUISA DE HEMATOZOÁRIOS

FINALIDADE

Esta pesquisa tem por finalidade identificar formas sanguíneas de parasitos, como:

- Microfilária.
- *Plasmodium*.
- *Trypanosoma cruzi*.
- *Babesia*.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste em esfregaço em camada delgada, esfregaço em gota espessa, técnica do micro-hematócrito e técnica de Knott (pesquisa de microfilárias).

PROCEDIMENTOS

Pesquisa de hematozoários – esfregaço em camada delgada

Neste método, são utilizadas duas lâminas. Uma recebe uma minúscula gota de sangue,1µL aproximadamente, e a outra, em ângulo de 30°, faz essa gota se espalhar pela superfície de contato das duas lâminas (esfregaço). Deixa-se secar ao ar, fixar e corar. Por não concentrar uma quantidade maior de material, este método pode apresentar desvantagens em comparação ao esfregaço em gota espessa. Entretanto, é um método mais rápido. Utiliza-se na pesquisa de malária (Figura 7.26), *Babesia*, histoplasma (Figura 7.27), *Leishmania* (Figura 7.28) e doença de Chagas (Figura 7.29).

Pesquisa de hematozoários – esfregaço em gota espessa

Coletar 2 a 3 gotas de sangue em uma lâmina. Utilizando o canto de outra lâmina, espalha-se o sangue numa camada circular com 15mm de diâmetro. Deixa-se secar ao ar por 12h. Coloca-se a lâmina com a gota espessa num recipiente com água para a desemoglobinização das hemácias. Com a ruptura das hemácias, a cor vermelha da hemoglobina desaparece da mancha de sangue e dá lugar a uma área esbranquiçada. Retira-se a lâmina com cuidado e deixa-se secar, fixar e corar. Utiliza-se na pesquisa de malária e microfilária (Figura 7.30).

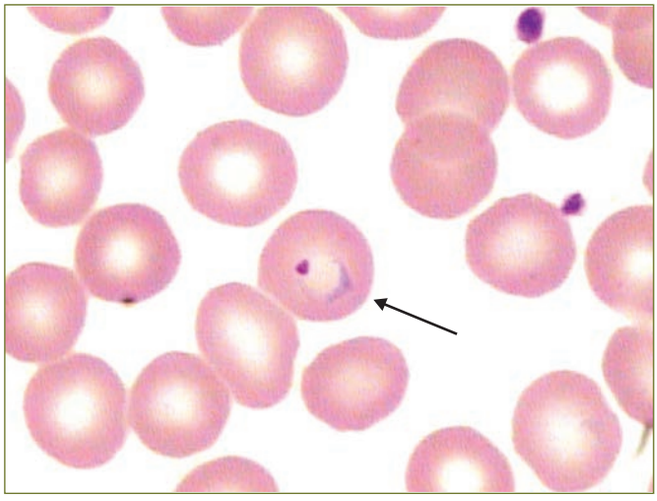


Figura 7.26 Malária: trofozoíto de *Plasmodium vivax* (*seta*) (2.000×)

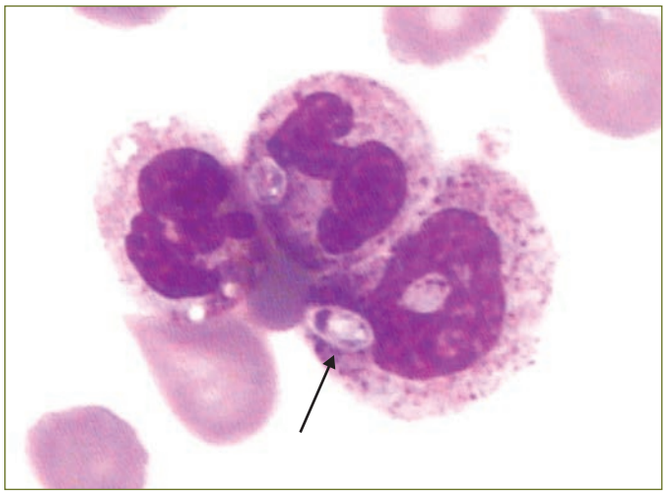


Figura 7.27 Histoplasma (*seta*) (2.000×)

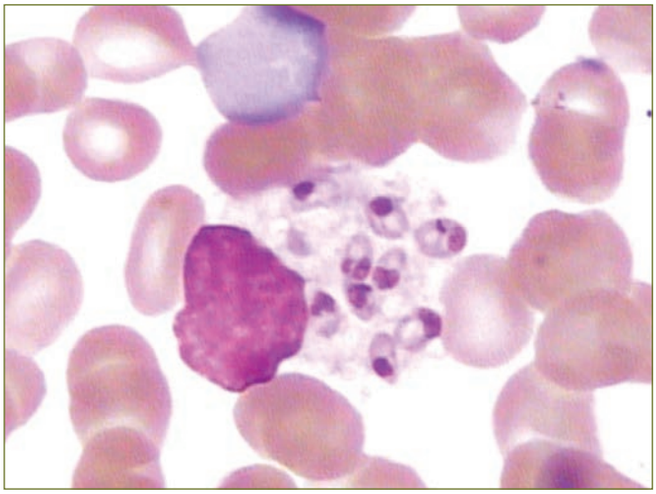


Figura 7.28 Leishmania: trofozoíto (2.000×)

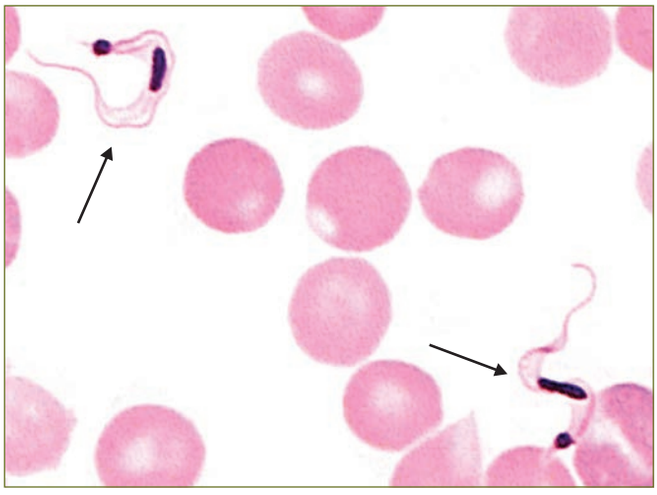


Figura 7.29 Doença de chagas: *Tripanosoma cruzi* (*setas*) (2.000×)

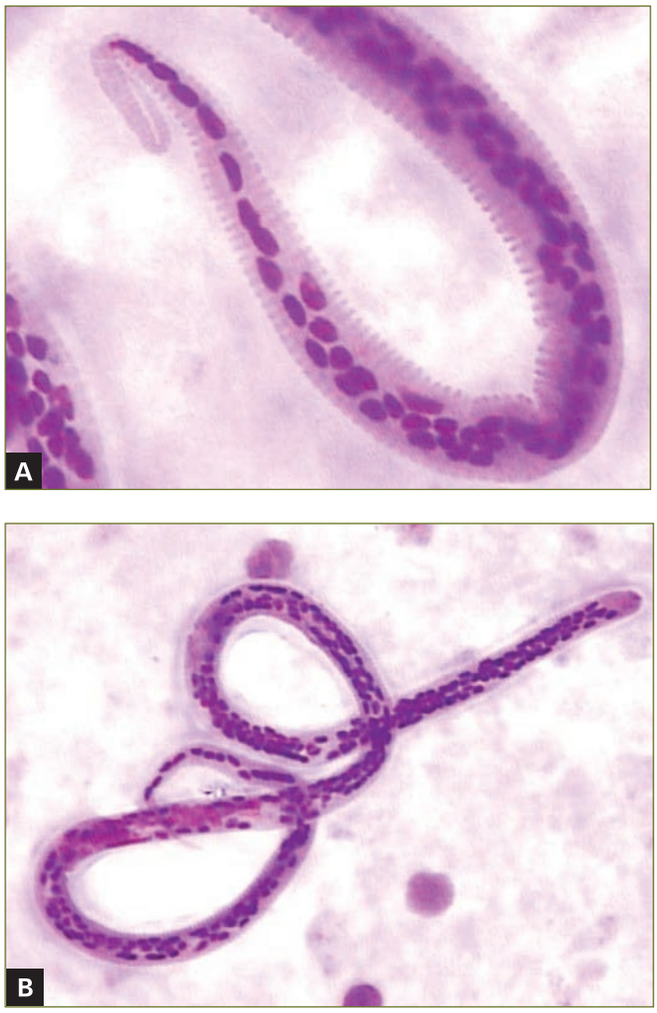


Figura 7.30 (**A** e **B**) Filariose: *Wuchereria bancrofti* (microfilárias) (2.000×)

Pesquisa de hematozoários – técnica do micro-hematócrito

O método consiste na centrifugação do sangue com anticoagulante durante 3min, em tubos capilares. É utilizada no diagnóstico das formas sanguíneas de *Trypanosoma* spp. e microfilárias. Nestes exames, podem-se observar os movimentos dos parasitos. Entretanto, é necessária a observação dos parasitos nas lâminas coradas.

Pesquisa de hematozoários – técnica de Knott (pesquisa de microfilárias)

Retiram-se 2mL de sangue total por punção venosa e coloca-se o material imediatamente em um tubo contendo 10mL de formol a 2%. Fecha-se o tubo e mistura-se completamente. O formol hemolisa as hemácias, fixando e distendendo as microfilárias. Centrifuga-se a 1.500rpm por 5min. Decanta-se o sobrenadante, retira-se o sedimento com uma pipeta e espalha-se na forma de gota espessa em uma lâmina. Deixa-se secar bem e cora-se com Giemsa. Pesquisam-se microfilárias no microscópio em objetivas de 10×, 20× e 40×.

PESQUISA DE CÉLULAS LE

FINALIDADE

Esta pesquisa tem por finalidade o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES) e o exame auxiliar no diagnóstico de hepatite lupoide (hepatite crônica ativa).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na pesquisa de anticorpos antinucleares. Os núcleos das células lisadas pela ação do complemento são fagocitadas pelos neutrófilos, apresentando-se sob forma de inclusões citoplasmáticas violáceas homogêneas ou livres. O fenômeno LE é uma demonstração indireta de anticorpos antinucleares.

PROCEDIMENTO

Deixa-se coagular 10mL de sangue à temperatura ambiente por 15min e, em seguida, incuba-se em banho-maria a 37°C por 2h. Retira-se e esmaga-se o coágulo em peneira (Figura 7.31) e, depois, coloca-se em um tubo de Wintrobe, centrifugando a 2.000rpm por 10min. Ao final, despreza-se o soro e são feitas várias lâminas (Figura 7.32) da camada leucocitária do material centrifugado. Coram-se e pesquisam-se, pelo menos, três células LE (Figura 7.33) típicas ao microscópio para liberar o resultado como positivo.

TESTE DE HANSEL – CITOLOGIA NASAL

FINALIDADE

Este teste serve como exame complementar para diagnóstico de rinopatias, infecções do trato respiratório e alergias (Figura 7.34).

Figura 7.31 (**A** a **D**) Maceração do coágulo e colocação do material com agulhão no tubo de Wintrobe

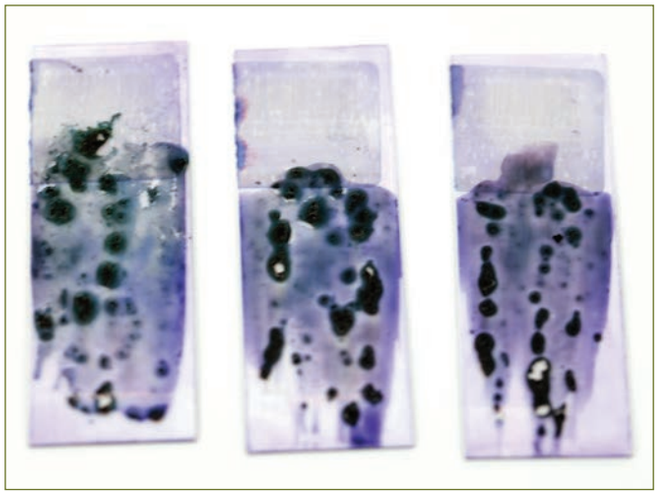
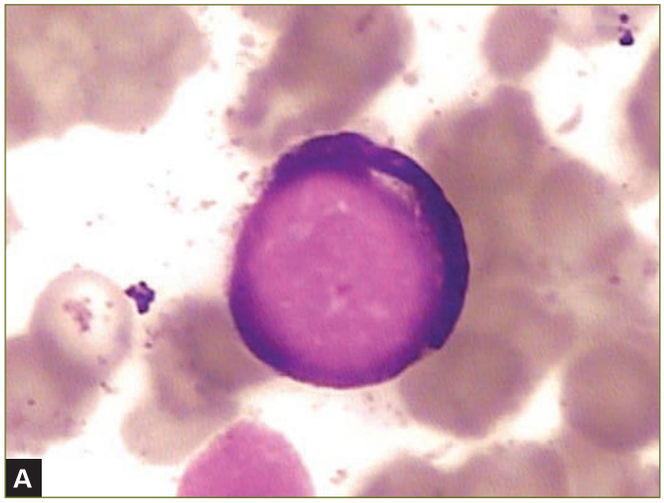


Figura 7.32 Lâminas de LE: confeccionadas após centrifugação do coágulo macerado



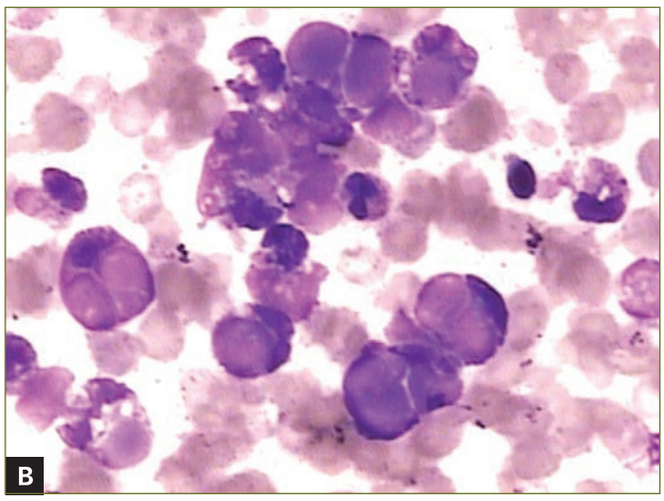


Figura 7.33 (**A** e **B**) LE positiva: neutrófilo com material nuclear fagocitado (2.000×)

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste no estudo citológico da secreção da mucosa nasal, após coloração Wright-Giemsa.

PROCEDIMENTO

Após o *swab* nasal, deve-se fazer o esfregaço realizando movimentos de dentro para fora para não passar duas vezes pelo mesmo local (Figura 7.35). Espera-se secar e realiza-se o procedimento de coloração.

TEMPO DE SANGRAMENTO (MÉTODO DE DUKE)

FINALIDADE

De acordo com o tempo de sangramento, avalia-se a hemostasia primária, analisando a função plaquetária e a integridade funcional dos vasos sanguíneos.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método mede o tempo decorrido do sangramento até cessar por meio de uma punção com lanceta de tamanho padronizado no lóbulo da orelha.

PROCEDIMENTO

Realiza-se assepsia do lóbulo da orelha e, com o auxílio de uma lanceta específica, faz-se uma incisão (Figura 7.36). No mesmo instante, dispara-se o cronômetro e, a cada 15s, enxuga-se a gota de sangue em papel de filtro, até parar (Figura 7.37). Anota-se o tempo decorrido até a última gota enxugada. Se o sangramento não parar em 15min, interrompe-se o teste.

Valor normal: de 1 a 3min.

TEMPO DE SANGRAMENTO (MÉTODO DE IVY)

FINALIDADE

A finalidade deste método é avaliar a hemostasia primária, analisando a função plaquetária e a integridade funcional dos vasos sanguíneos.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste em medir o tempo decorrido do sangramento até cessar, por meio de duas incisões de lanceta de tamanho padronizado, no antebraço (Figura 7.38) separadas de 5 a 10cm uma da outra.

PROCEDIMENTO

No antebraço livre de pelos e veias, limpa-se com algodão com álcool. Posiciona-se o tensiômetro na pressão de 40mmHg e

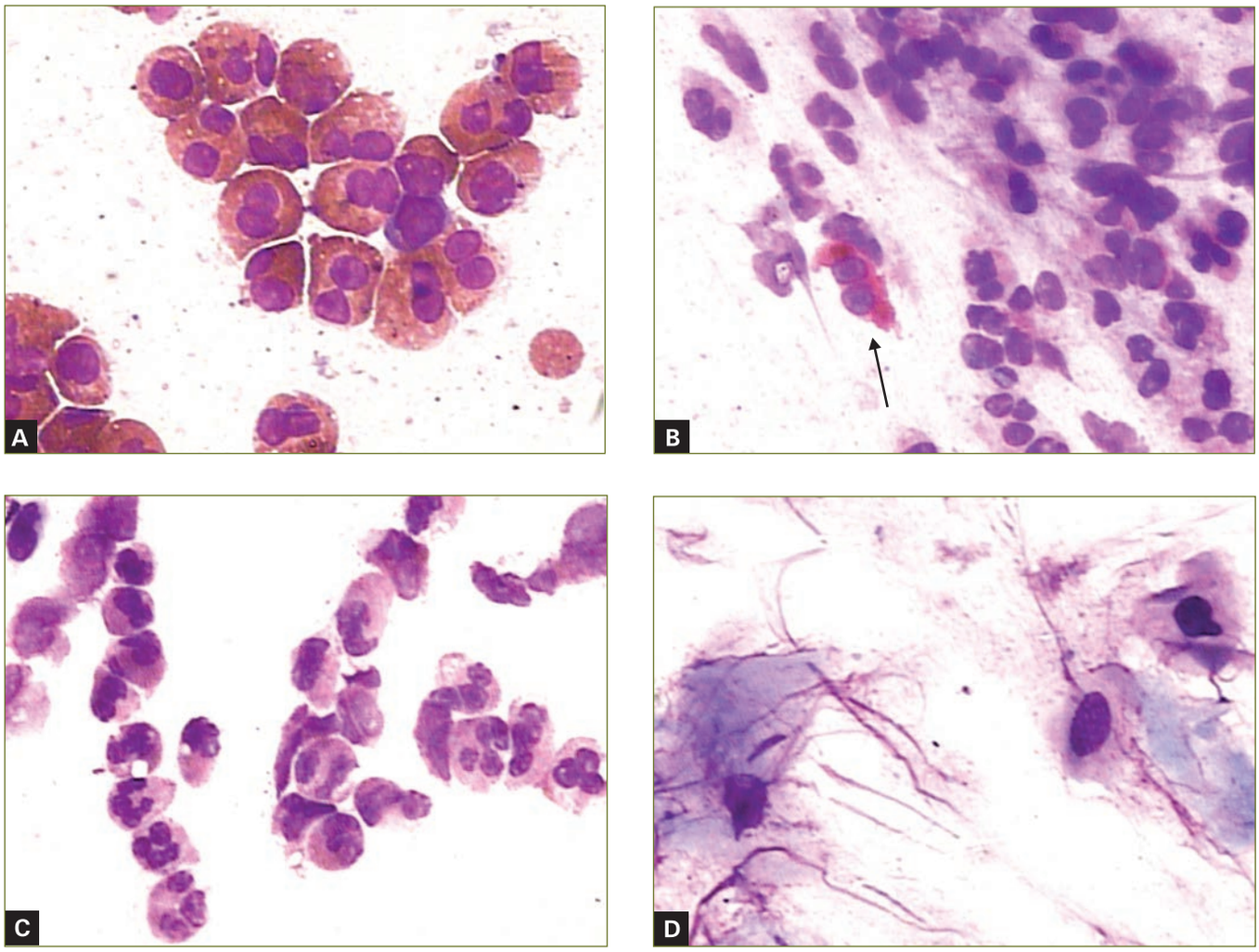


Figura 7.34 (**A** a **D**) Padrões para liberação do resultado: material muito rico em células, constituído em 100% por eosinófilos (**A**). Material muito rico em células, constituído em 100% por neutrófilos e 100% por eosinófilos (*seta*) (**B**). Material rico em células, constituído em 100% por neutrófilos (**C**). Presença de filamentos de muco, várias células epiteliais e ausência absoluta de leucócitos (**D**)

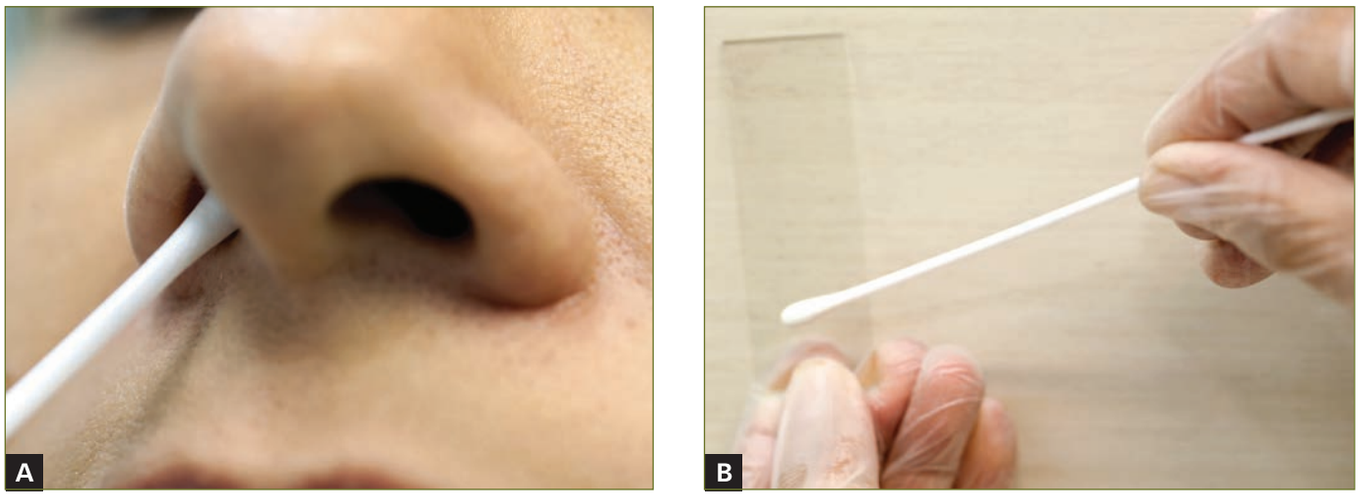


Figura 7.35 (**A** e **B**) *Swab* nasal (**A**) e confecção de esfregaço realizando movimentos de dentro para fora para não passar duas vezes pelo mesmo local (**B**)

Figura 7.36 Tempo de sangramento (método de Duke): lanceta específica fazendo uma incisão no lóbulo da orelha

Figura 7.37 Tempo de sangramento (método de Duke): enxugando a gota de sangue em papel-filtro

Figura 7.38 Tempo de sangramento (método de Ivy): fazendo as punções com lanceta no antebraço

mantém-se até o fim ao redor do braço aproximadamente 6cm acima da dobra anticubital. Na região volar lateral, cerca de 3 a 5cm abaixo da dobra antecubital, são feitas as punções com lanceta e começa-se a marcar no cronômetro. A cada 30s, remove-se o sangue com o papel-filtro que se forma na lesão (Figura 7.39). Quando o sangramento parar, anota-se o tempo decorrido até os 30s mais próximos. Se o sangramento não parar em 15min, interrompe-se o teste.

Valores normais: de 2 a 7min.

TEMPO DE COAGULAÇÃO

FINALIDADE

O tempo de coagulação tem por finalidade avaliar os fatores da via intrínseca da coagulação e detectar alterações no sistema global da coagulação, principalmente no fibrinogênio.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método mede o tempo que o sangue coagula *in vitro*.

PROCEDIMENTO

Após a punção venosa, dispara-se o cronômetro e coloca-se o sangue no tubo e imediatamente em banho-maria a 37°C. Após 3min da coleta, inicia-se a observação do tubo inclinando-o suavemente a cada 30s até que o sangue coagule. Marca-se o tempo desde a coleta até a formação do coágulo.

Valores normais: 5 a 10min.

Figura 7.39 Tempo de sangramento (método de Ivy): começa-se a marcar no cronômetro o tempo e enxuga-se o sangue com papel-filtro a cada 30g

FIBRINOGÊNIO

FINALIDADE

A finalidade do fibrinogênio é confirmar o diagnóstico de patologias hemorrágicas. Valores diminuídos são observados na coagulação intravascular disseminada, na formação anormal de fibrina, na doença hepática, no câncer de próstata, no pâncreas ou no pulmão. Também é uma proteína de fase aguda que se eleva em toda situação envolvendo dano celular, infecção ou inflamação tissular e na gestação.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na precipitação do fibrinogênio em temperatura de 56°C em banho-maria e leitura visual após centrifugação (Figura 7.40).

PROCEDIMENTO

Preenche-se e leva-se o tubo de Wintrobe com plasma citratado ao banho-maria a 56°C por 3min. Desse modo, ocorrerá a precipitação do fibrinogênio (o plasma fica turvo). Centrifuga-se a 5.000rpm durante 3 a 5min e lê-se.

Valores normais: 200 a 400mg/dL.

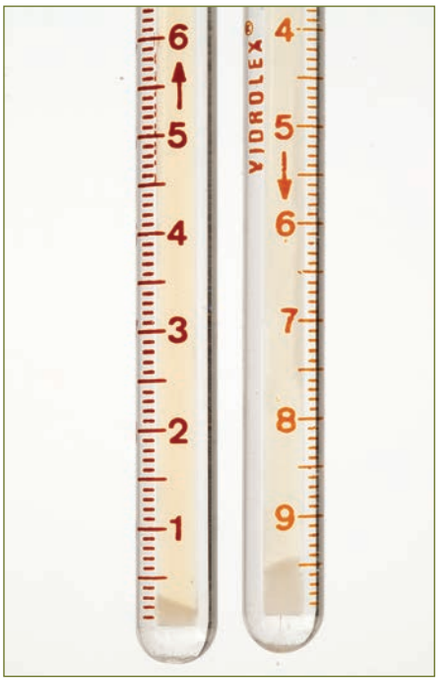


Figura 7.40 Precipitação do fibrinogênio (plasma turvo) centrifugado (*setas*)

PROVA DO LAÇO

FINALIDADE

A finalidade da prova do laço é avaliar a fragilidade capilar e as trombocitopenias e auxiliar no diagnóstico da dengue hemorrágica.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na visualização de petéquias pelo método de garroteamento do antebraço.

PROCEDIMENTO

Verifica-se a pressão do paciente (Figura 7.41), somam-se os valores da pressão diastólica e sistólica e divide-se por dois. O valor médio dos valores em mmHg deve ser insuflado no manguito (braçadeira do aparelho de pressão). Deixa-se apertando por 5min (em crianças até 3min). Deve-se marcar um quadrado medindo 2,5cm^2 abaixo 5cm da dobra anticubital. Observa-se a formação de petéquias. Se contar 20 ou mais petéquias na área marcada, considera-se a prova do laço positiva no adulto. Em crianças, caso haja 10 ou mais petéquias, considera-se a prova do laço positiva.

Figura 7.41 Prova do laço: verifica-se a pressão do paciente, utilizando a média dos valores em mmHg e insuflando o manguito. Convém verificar o torniquete no pulso. Deve-se fazer pressão por 5min e observar o aparecimento de petéquias

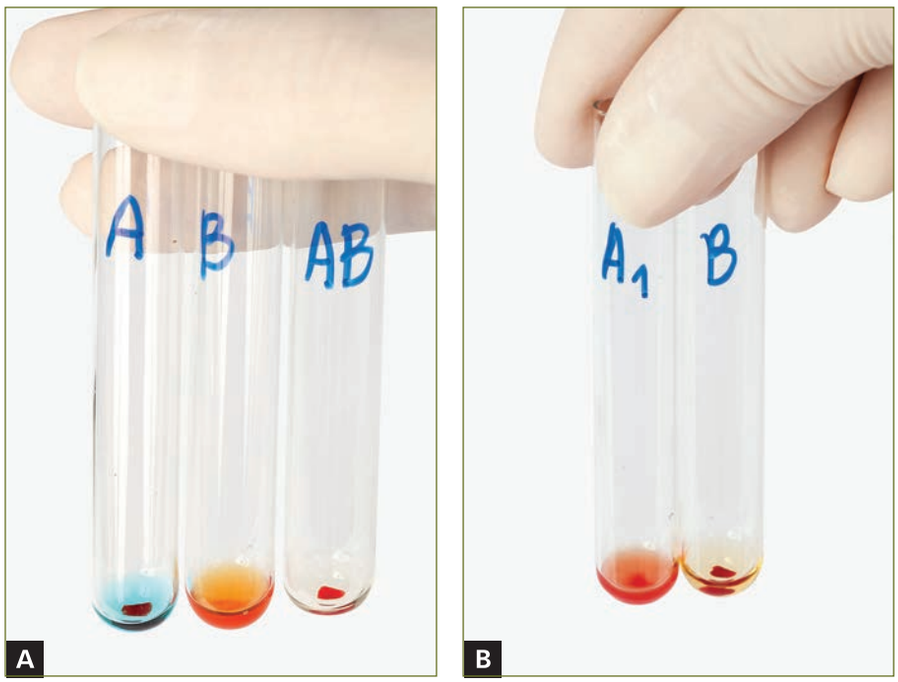


Figura 7.42 (**A** e **B**) Grupo sanguíneo A: provas direta (**A**) e reversa (**B**)

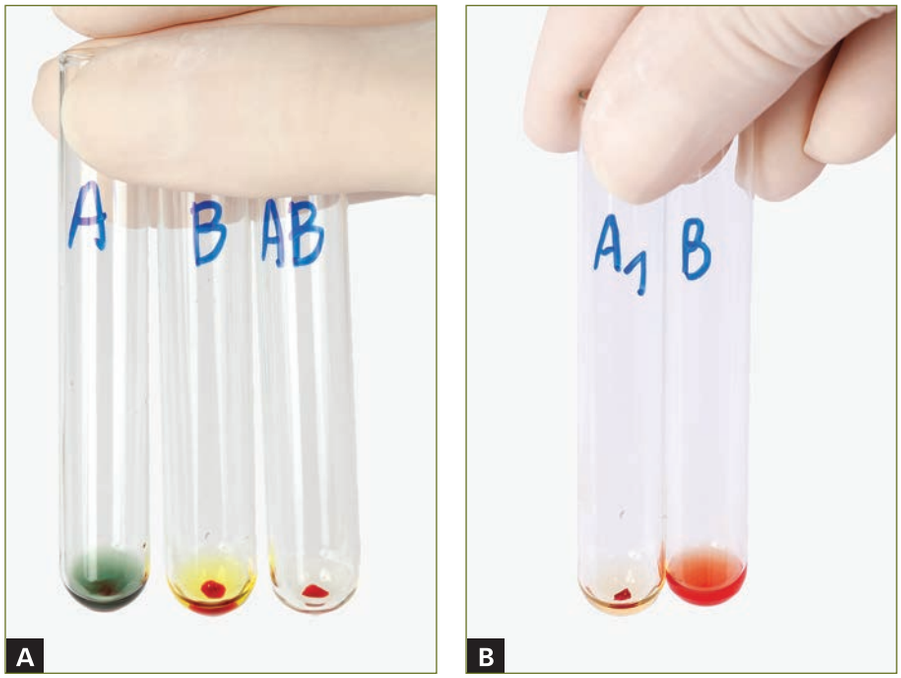


Figura 7.43 (**A** e **B**) Grupo sanguíneo B: provas direta (**A**) e reversa (**B**)

GRUPO SANGUÍNEO ABO – TÉCNICA EM TUBO

FINALIDADE

A finalidade da técnica em tubo é identificar a presença de antígenos nas hemácias (prova direta) e a pesquisa de anticorpos livres no plasma ou no soro (prova reversa) (Figuras 7.42 a 7.45).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A metodologia consiste na aglutinação em tubo de hemólise.

PROCEDIMENTO

Prova direta

Rotulam-se três tubos de hemólise: anti-A, anti-B e anti-AB. Coloca-se em cada tubo 1 gota dos soros anti-A, anti-B,

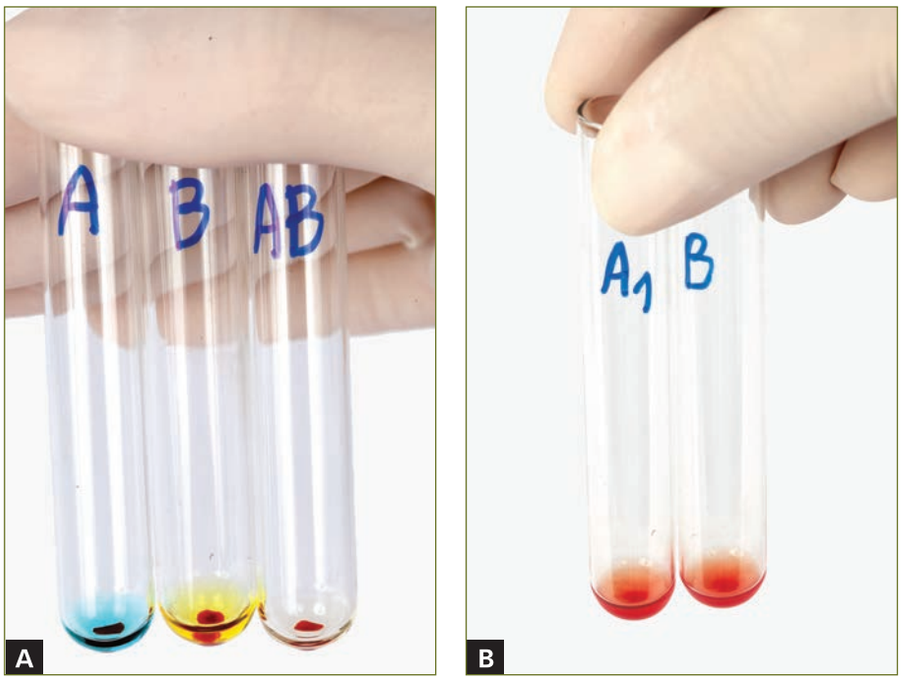


Figura 7.44 (**A** e **B**) Grupo sanguíneo AB: provas direta (**A**) e reversa (**B**)

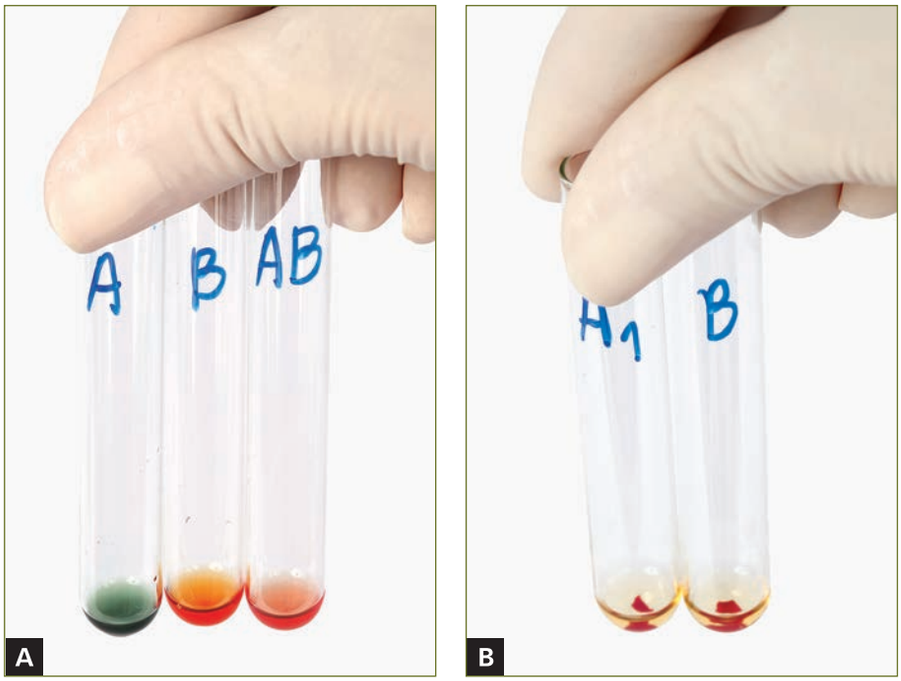


Figura 7.45 (**A** e **B**) Grupo sanguíneo O: provas direta (**A**) e reversa (**B**)

anti-AB, respectivamente. Em um tubo identificado, prepara-se uma suspensão a 5% das hemácias do paciente. Distribui-se 1 gota (ou 50µL) da suspensão nos tubos rotulados como anti-A. Centrifugam-se os tubos por 15s a 3.400rpm. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e leem-se macroscopicamente as reações, em graus de aglutinação. Interpretam-se e anotam-se os resultados.

Prova reversa

Rotulam-se dois tubos de hemólise: hemácia A e hemácia B. Colocam-se 2 gotas de soro do paciente a testar em cada tubo. Adicionam-se aos tubos hemácia A e hemácia B, 1 gota ou 50µL de suspensão a 5% de hemácias teste A e B respectivamente. Homogeneízam-se e centrifugam-se os tubos por 15s a 3.400rpm. Ressuspende-se delicadamente o botão de

hemácias formado e leem-se macroscopicamente as reações, em graus de aglutinação. Interpretam-se e anotam-se os resultados.

Observação: deixam-se os reagentes por 10min em temperatura ambiente, antes de iniciar a rotina. Convém observar sempre lote e validade dos reagentes.

Tipo sanguíneo	Aglutinogênios nas hemácias	Aglutininas no plasma
A	A	anti-B
B	B	anti-A
AB	A e B	-
O	-	anti-A e anti-B

FATOR RH "D" EM TUBO

FINALIDADE

A finalidade do Rh "D" em tubo é identificar o antígeno D normal e os D variantes dentro das hemácias. Determinado pelo aglutinogênio, chamado de fator Rh (D), está presente em 85% da população. Os 15% restantes encontramos nos indivíduos Rh (–).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na aglutinação em tubo (Figura 7.46).

PROCEDIMENTO

Em tubo devidamente identificado, prepara-se uma suspensão a 5% das hemácias do paciente, em solução de cloreto de sódio a 0,9%. Identificam-se dois tubos de hemólise D (teste) e C (controle), com o nome do paciente. Coloca-se no tubo D 1 gota do soro anti-D e, no tubo C, 1 gota de soro controle Rh. Acrescenta-se a cada tubo 1 gota (ou 50µL da suspensão) a 5% das hemácias a testar e homogeneíza-se. Centrifugam-se os tubos por 15s a 3.400rpm.

Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e leem-se macroscopicamente as reações, em grau de aglutinação. Interpretam-se e anotam-se os resultados.

RESULTADOS

Os resultados podem ser os seguintes:

- Presença de aglutinação (teste positivo).
- Ausência de aglutinação (teste negativo).

Observação: o soro anti-D deve ser acompanhado do soro controle Rh, ambos do mesmo fabricante. Convém observar sempre o lote e a validade dos reagentes.

Em indivíduos Rh negativos, é necessária a pesquisa da variante fraca do antígeno Rh (D), chamada de variante DU, por meio de reação de Coombs para DU.

PESQUISA DE "D" FRACO

FINALIDADE

A finalidade da pesquisa de "D" fraco é validar e reconhecer variantes do sistema Rh. Antes, era chamado de antígeno D fraco.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na hemaglutinação. Hemácias com antígenos D fraco reagem fracamente com soro anti-D, dando a

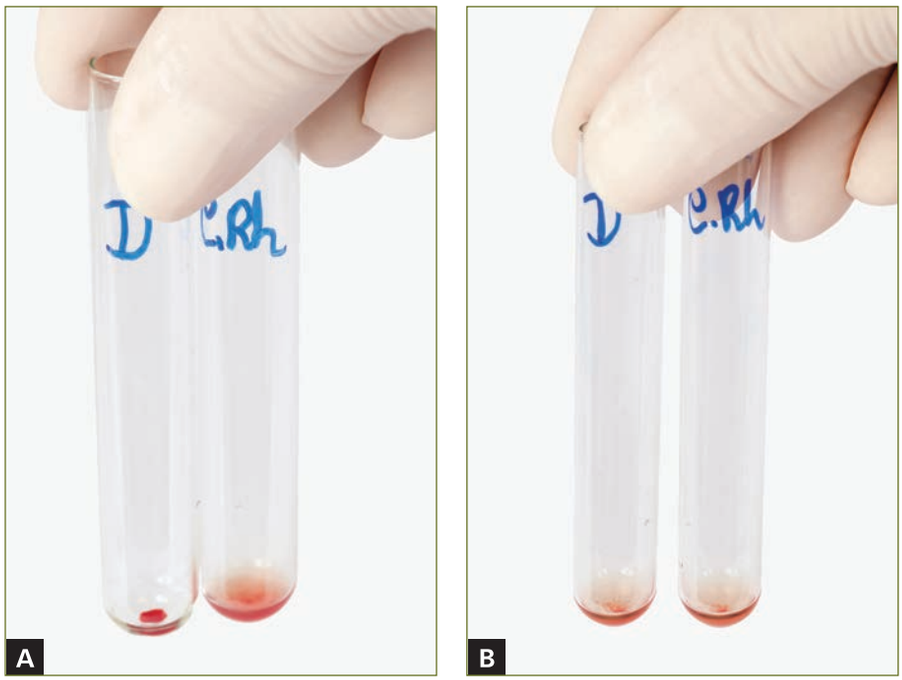


Figura 7.46 (**A e B**) Rh positivo e controle Rh negativo (**A**), Rh negativo e controle Rh negativo (**B**)

reação de intensidade variável, e são demonstradas por meio de prova da antiglobulina.

PROCEDIMENTO – TÉCNICA EM TUBO

Lavam-se três vezes com solução (cloreto de sódio 0,9%) 10 gotas de concentrado de hemácias do paciente. Prepara-se uma suspensão a 5% das hemácias lavadas, identificando-a corretamente. Rotulam-se dois tubos de hemólise: D e C, com o nome do paciente. Coloca-se 1 gota de soro anti-D no tubo D e 1 gota de soro-controle Rh no tubo C. Adiciona-se 1 gota da suspensão a 5% do paciente em ambos os tubos e homogeneíza-se. Incubam-se as reações por 15min em banho-maria a 37°C. Após 15min, centrifugam-se os tubos por 15s a 3.400rpm e observa-se a presença de hemólise no sobrenadante. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e leem-se macroscopicamente as reações em grau de aglutinação com auxílio de um visor/lupa. Interpretam-se e anotam-se os resultados em grau de aglutinação. Lavam-se 3 vezes com solução salina a 37°C as reações dos tubos D e C, decantando o sobrenadante, por inversão. Ressuspende-se o botão de hemácias a cada adição de salina. Após o último procedimento, decanta-se completamente o sobrenadante, por inversão, e enxuga-se a borda dos tubos invertidos com papel absorvente. Adicionam-se 2 gotas de soro antiglobulina humana (soro de Coombs) em ambos os tubos, homogeneizando. Após 15min, centrifugam-se os tubos por 15s a 3.400rpm e observa-se a presença de hemólise no sobrenadante. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e leem-se macroscopicamente as reações, em grau de aglutinação com auxílio de um visor/lupa (Figura 7.47). Interpretam-se e anotam-se os resultados conforme o grau de aglutinação.

INTERPRETAÇÃO

Reação a 37°C		Reação com AGH (soro de Coombs)		Fator RhD
Anti-D	Controle Rh	Anti-D	Controle Rh	Fator RhD
1ª condição – Negativa	Negativo	Anti-D negativo	Negativo	Negativo
2ª condição – Negativa	Negativo	+	Negativo	Positivo fraco

COOMBS DIRETO

FINALIDADE

A finalidade do Coombs direto é auxiliar no diagnóstico de anemias hemolíticas do recém-nascido, doenças autoimunes e anemias hemolíticas induzidas por drogas. A identificação se dá pelos anticorpos aderidos à superfície das hemácias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na hemaglutinação, uma técnica utilizada na detecção de anticorpos específicos que, quando presentes, reconhecerão antígenos na superfície das hemácias, provocando aglutinação.

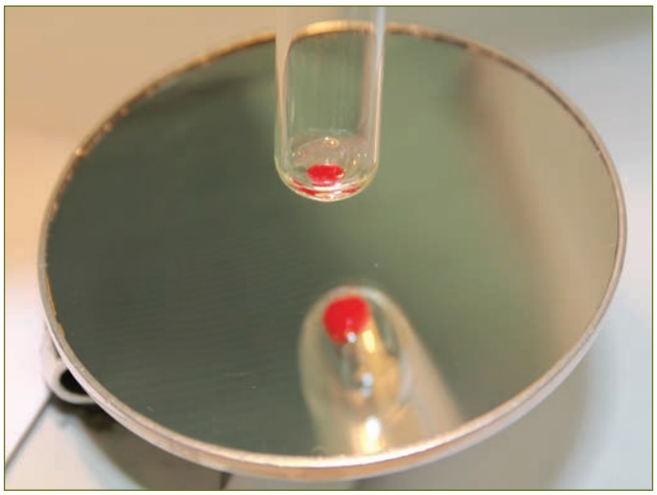


Figura 7.47 Lupa: leitura das reações em grau de aglutinação

PROCEDIMENTO – TÉCNICA EM TUBO

Lavam-se três vezes com salina à temperatura ambiente 10 gotas de concentrado de hemácias do paciente. Prepara-se uma suspensão a 5% das hemácias lavadas. Identificam-se três tubos de hemólise – CDS, CDP, CDM, com o nome do paciente: (S) – Suspensão; (P) – Poliespecífico; (M) – Monoespecífico. Colocam-se nos dois tubos 1 gota de suspensão de hemácias a 5% do paciente. Lavam-se os tubos CDP e CDM, uma vez com salina a 37°C. Decanta-se completamente o sobrenadante, por inversão, enxugando a borda dos tubos com papel absorvente. Adicionam-se aos tubos CDP 2 gotas do soro antiglobulina humana poliespecífico e, ao tubo CDM, 2 gotas de soro antiglobulina humana monoespecíficas. Homogeneízam-se e centrifugam-se os tubos por 15s a 3.400rpm. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e verifica-se a presença de aglutinação, com ajuda de uma lupa. Interpretam-se e anotam-se os resultados em graus de aglutinação.

PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES

FINALIDADE

Nesta pesquisa, detectam-se anticorpos antieritrocitários livres no soro por meio da sensibilização *in vitro.* Há teste de compatibilidade pré-transfusional e determinação de antígenos que não são evidenciados por aglutinação direta (várias formas fracas de "D" antígenos Duffy, Kell e Kidd).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método consiste na hemaglutinação.

PROCEDIMENTO

Numeram-se dois tubos de hemólise: I e II, com nome do paciente. Colocam-se em cada tubo 2 gotas de hemácias – teste I e II, respectivamente. Lava-se a gota, contida nos tubos I e II, 1 vez com solução de Liss, decantando totalmente o sobrenadante, por inversão. Após a lavagem, enxuga-se a borda dos tubos invertidos com papel absorvente. Colocam-se 2 gotas de solução de Liss nos respectivos tubos. Homogeneízam-se as suspensões. Adicionam-se a cada tubo 2 gotas de soro do paciente a testar, homogeneizando. Centrifuga-se por 15s a 3.400rpm. Convém observar a presença de hemólise no sobrenadante. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e verifica-se a presença de aglutinação, com ajuda de uma lupa. Interpretam-se e anotam-se os resultados em graus de aglutinação. Incubam-se as reações por 10min em banho-maria a 37ºC. Centrifuga-se o material por 15s a 3.400rpm. Convém observar a presença de hemólise no sobrenadante. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e verifica-se a presença de aglutinação, com ajuda de uma lupa. Interpretam-se e anotam-se os resultados em graus de aglutinação. Lava-se 3 vezes com salina a 37ºC a reação dos tubos I e II, decantando totalmente o sobrenadante, por inversão. Após cada lavagem, ressuspende-se o botão de hemácias formado a cada adição de salina. Após a última lavagem, enxuga-se a borda dos tubos invertidos com papel absorvente. Adicionam-se aos tubos 2 gotas de soro antiglobulina humana poliespecífico. Centrifuga-se o material por 15s a 3.400rpm. Convém observar a presença de hemólise no sobrenadante. Ressuspende-se delicadamente o botão de hemácias formado e verifica-se a presença de aglutinação, com ajuda de uma lupa. Interpretam-se e anotam-se os resultados em graus de aglutinação (Figura 7.48).

INTERPRETAÇÃO

Se houver hemólise e/ou aglutinação nos tubos I e/ou II, em qualquer uma ou em todas as fases, o resultado é positivo (expresso em cruz). Caso não haja hemólise e/ou aglutinação nos tubos I e/ou II, em todas as fases, o resultado é negativo.

Observação: só na fase de AGH adiciona-se aos testes negativos 1 gota da suspensão de hemácias sensibilizadas (controle de Coombs).

PROVA DE COMPATIBILIDADE (PROVA CRUZADA)

FINALIDADE

A prova cruzada consiste na mistura do soro do receptor com as hemácias do doador, com a finalidade de investigar no soro ou no plasma do receptor anticorpos contra os antígenos de grupos sanguíneos presentes nas hemácias do doador. Geralmente, determinações erradas de tipagem ABO resultam em prova cruzada incompatível devido às isoaglutininas naturais (A e B), mas em relação ao sistema Rh isso, naturalmente, não acontece. Por isso, o sangue de um doador Rh positivo tipado erroneamente como Rh negativo será "compatível" com um paciente Rh negativo, o que resulta em aloimunização ao antígeno D, devido à alta antigenicidade do antígeno D.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A prova cruzada, assim como a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) pode ser realizada com a adição de substâncias potencializadoras. Em geral, utiliza-se solução de polietilenoglicol (PEG) a 20%.

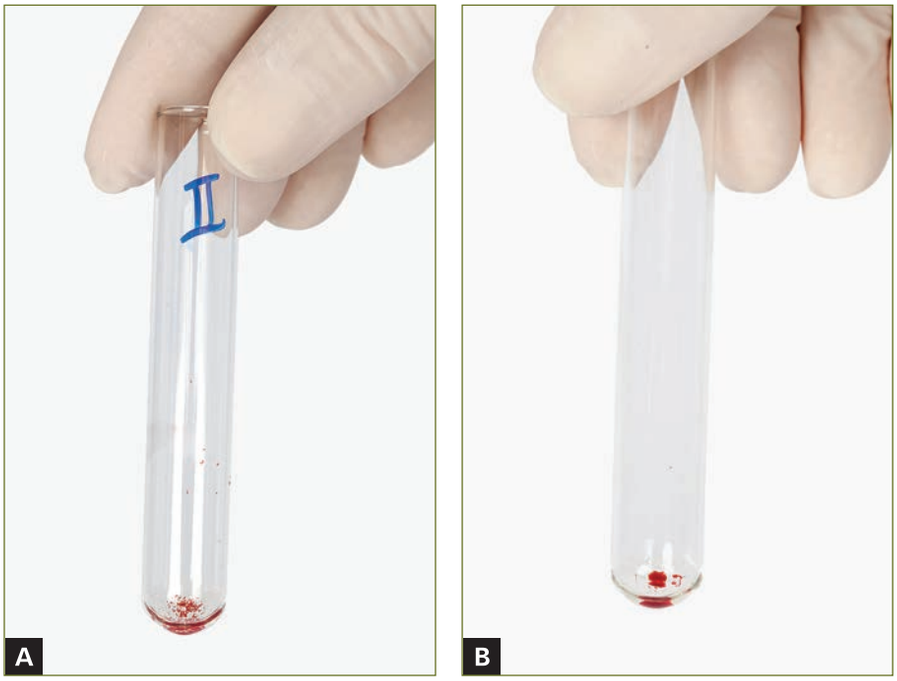


Figura 7.48 (**A** e **B**) Pesquisa de anticorpos irregulares: resultado positivo ++ (**A**); pesquisa de anticorpos irregulares: resultado positivo +++ (**B**)

PROCEDIMENTO

Etapa 1 (fase temperatura ambiente)

Retira-se da câmara de conservação o concentrado de hemácia que deverá ser cruzado com o receptor. Homogeneíza-se com muito cuidado o sangue contido no espaguete, evitando os coágulos e a amostra hemolisada. Retira-se uma amostra de hemácias do segmento do espaguete do concentrado de hemácia e coloca-se em um tubo de ensaio devidamente identificado. Lavam-se as hemácias três vezes em salina 0,9% (teste de hemólise), decantando bem o sobrenadante da última lavagem. É feita uma suspensão, aproximadamente a 5%, e identifica-se o tubo de ensaio no qual será realizada a prova de compatibilidade. Colocam-se no tubo 2 gotas de soro do paciente e 1 gota da suspensão de hemácias do concentrado de hemácia. Centrifuga-se por 15s a 3.000rpm. Realiza-se a leitura imediata da reação para descartar a incompatibilidade ABO.

Etapa 2 (fase da AGH – teste indireto)

Acrescentam-se ao tubo 2 gotas de Bio PEG. Homogeneíza-se e incuba-se o material a 37°C por 15min. Lava-se três vezes em salina 0,9% decantando muito bem o sobrenadante da última lavagem. Acrescenta-se no tubo 1 gota de soro de Coombs e homogeneíza-se. Centrifuga-se por 15s a 3.000rpm. Realiza-se a leitura final da prova de compatibilidade. Um resultado positivo na prova cruzada requer mais estudos. Assim, o paciente não deverá ser transfundido até que a causa da incompatibilidade tenha sido completamente esclarecida.

HEMAGLUTINAÇÃO EM GEL

FINALIDADE

A finalidade da hemaglutinação em gel é identificar a presença de antígenos nas hemácias (prova direta) e pesquisar anticorpos livres no plasma ou no soro (prova reversa).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A metodologia consiste na hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação. É utilizada para microtipagem, pesquisa, titulação de anticorpos e provas de compatibilidade.

PROCEDIMENTO

Colocam-se nos respectivos furos da estante os tubos da amostra bem centrifugada ao lado de um tubo já contendo 500μL de diluente (LISS) em direção a um cartão. Identificam-se os cartões e pipetam-se 25μL de hemácias (sedimento) no tubo contendo 500μL de diluente. Abre-se o cartão devidamente identificado e pipetam-se 12,5μL, da suspensão de hemácias, nos microtubos A,B,D/A,B,D, para a identificação do grupo sanguíneo e do fator Rh. Centrifuga-se e lê-se o material. A leitura do cartão pode ser feita visualmente ou pelo leitor de cartão (Figuras 7.49 a 7.54).

- **Amostra**: hemácias (sedimento).
- **Suspensão**: 500μL de diluente + 25μL de hemácias (sedimento).
- **Diluente (LISS)**.

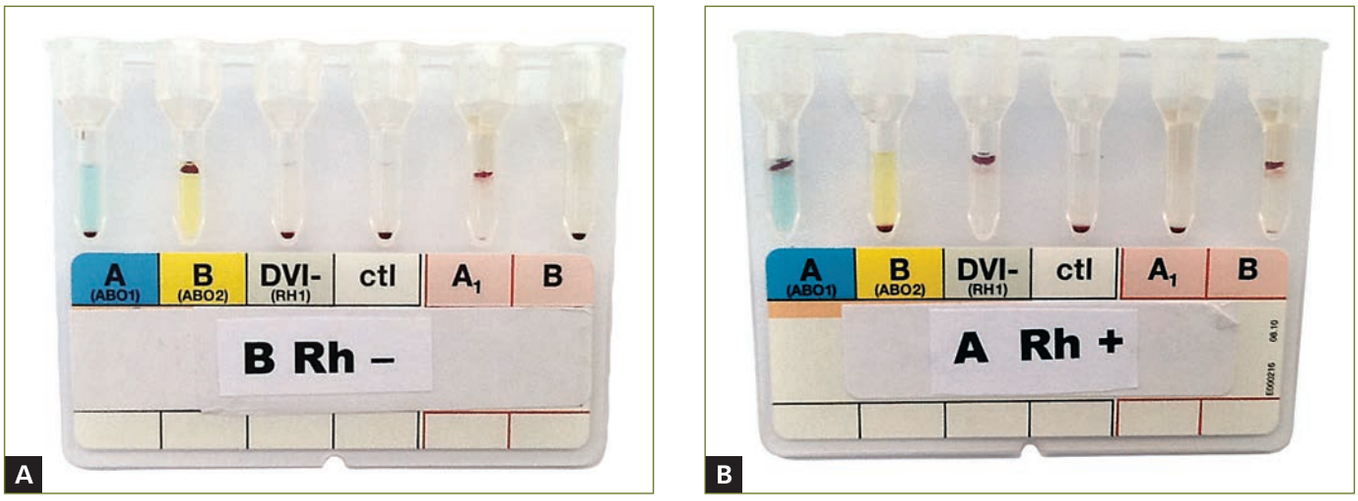
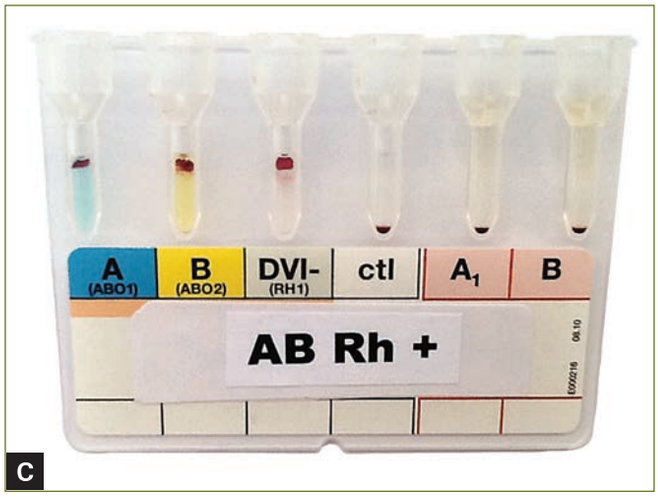


Figura 7.49 (**A** a **D**) ABO-Rh (monoclonal) – metodologia de hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação



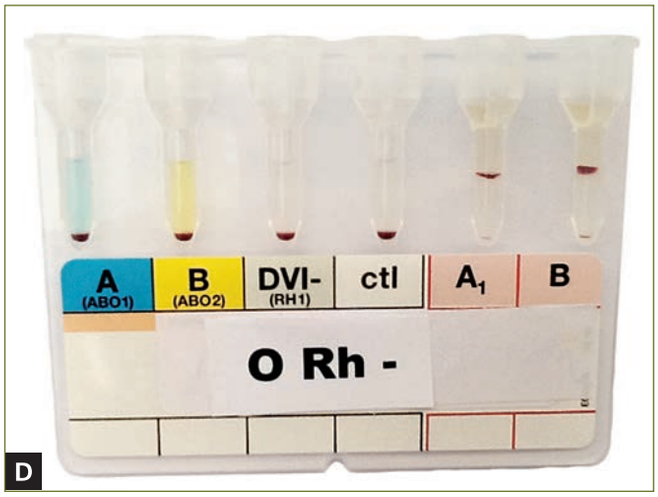


Figura 7.49 (**A** a **D**) (*continuação*) ABO-Rh (monoclonal) – metodologia de hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação

Figura 7.50 Metodologia de hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação: estação de trabalho

Figura 7.51 Metodologia de hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação: centrífuga de cartões

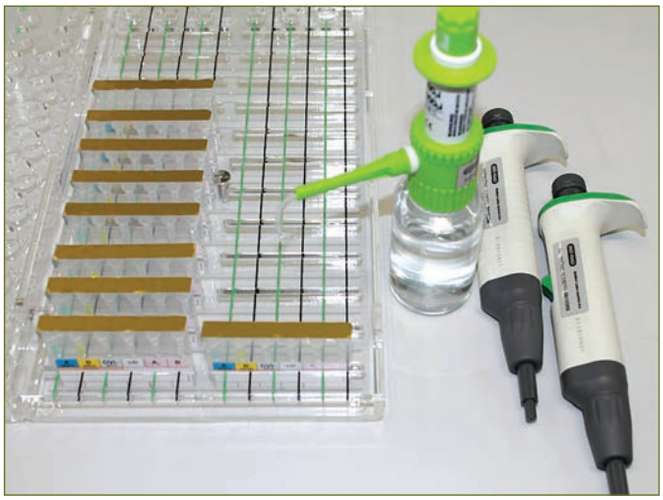


Figura 7.52 Metodologia de hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação: estação de trabalho

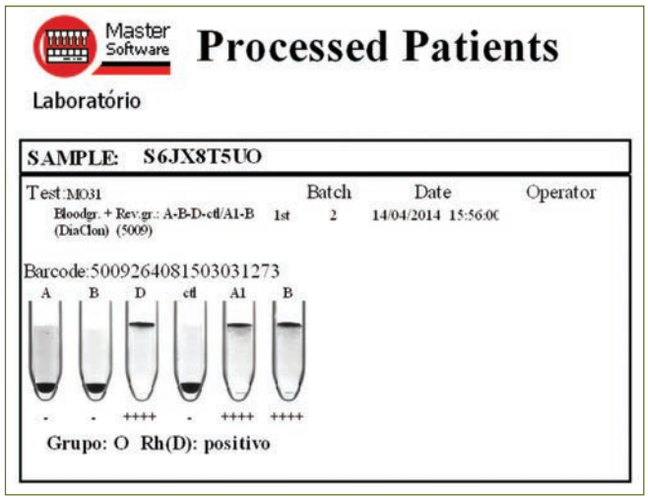


Figura 7.54 Metodologia de hemaglutinação em microplaca e gel centrifugação: Resultado emitido pelo leitor de cartão e liberado para o paciente

Figura 7.53 Leitor de cartão: Método em gel

8

Técnicas Automatizadas

HEMOGRAMA AUTOMATIZADO

O hemograma automatizado é um exame auxiliar na orientação diagnóstica e no acompanhamento de várias patologias. Os elementos figurados do sangue são avaliados por meio dos contadores hematológicos eletrônicos, que contam, medem e identificam as células, utilizando diferentes métodos combinados (Figura 8.1), como volume da célula, condutividade por radiofrequência, dispersão de raio *laser*, corrente direta e foco hidrodinâmico, dependendo do modelo e do fabricante do contador. Estes equipamentos possibilitam não só a contagem global, como a contagem diferencial dos leucócitos em vários modelos, além de fornecerem índices e histogramas de distribuição por volume (Figuras 8.2 e 8.3).

Os contadores hematológicos eletrônicos também contam as plaquetas e fornecem seu histograma específico, informando a presença de anisocitose plaquetária e grumos de plaquetas (Figura 8.4). Também informam sinais de alerta (*flags*),

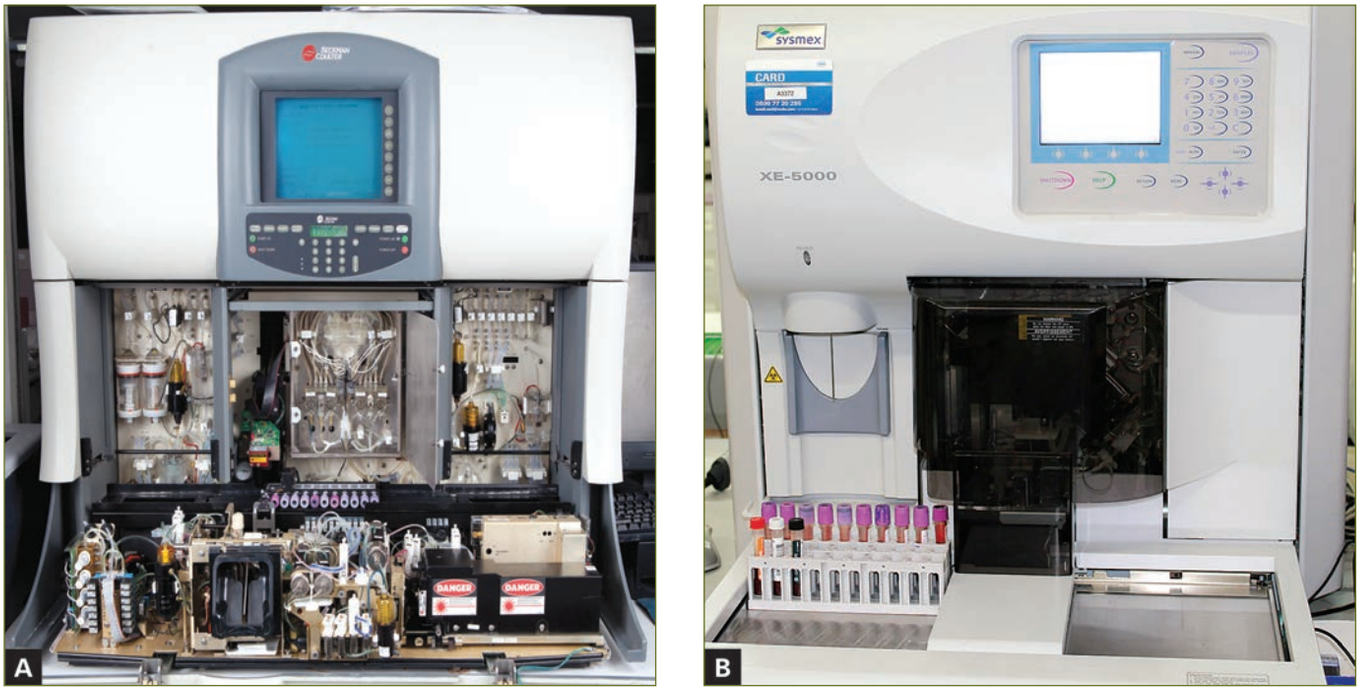


Figura 8.1 (**A** e **B**) Contadores hematológicos eletrônicos

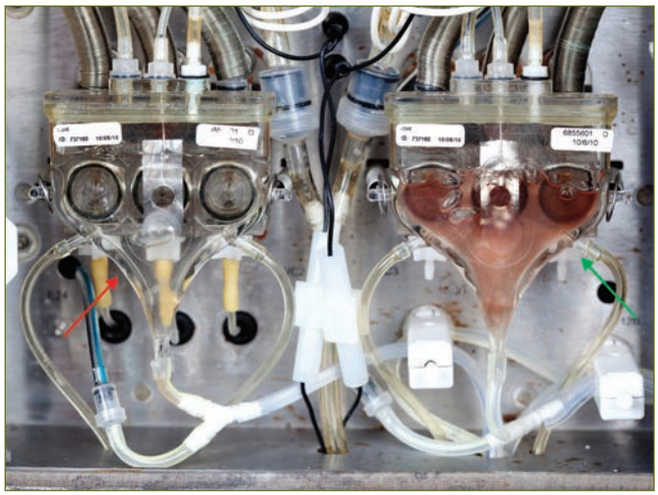


Figura 8.2 Contadores hematológicos eletrônicos: câmaras de contagens; de leucócitos e hemácias, sangue diluído (*seta vermelha*), hemoglobina e plaquetas, sangue hemolisado (*seta verde*)

- **Desvio da luz polarizada**: quantifica os elementos sanguíneos, distinguindo-os pela complexidade celular devido ao grau de divergência que a célula causa quando o *laser* incide em seu citoplasma.
- **Impedância**: demonstra o volume celular por meio do impedimento da passagem de eletricidade entre dois compartimentos isotonicamente banhados.

A tecnologia da diferencial leucocitária foi estabelecida no citômetro de fluxo hematológico Coulter VCS. Hemácias e plaquetas são contadas em um canal usando o método de impedância e foco hidrodinâmico que minimiza os fenômenos de coincidência e recirculação.

Os equipamentos automatizados avançados (Figura 8.6) utilizam diferentes canais com impedâncias específicas, que possibilitam contagens de eritrócitos (Figura 8.7), leucócitos e plaquetas ao mesmo tempo. Além disso, podem apresentar junto com essa função básica os seguintes recursos: citometria de fluxo, citoquímica e citologia diferencial com capacidade de distinguir células imaturas (reticulócitos e blastos).

quando há anormalidades. A análise automatizada tem facilitado o desempenho da rotina laboratorial, disponibilizando equipamentos que possibilitam análises de 30 hemogramas/hora até 120 hemogramas/hora.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Várias técnicas e princípios são utilizados na análise do hemograma automatizado (Figura 8.5), como:

- **Espectofotometria**: reage com o ferrocianeto de potássio, técnica colorimétrica para quantificar a hemoblogina.

VELOCIDADE DE HEMOSSEDIMENTAÇÃO AUTOMATIZADO

Método auxiliar no diagnóstico e na monitoração de doenças inflamatórias, malignas e de doenças do tecido conectivo. A VHS automatizada é a medida da velocidade da separação entre as hemácias e o plasma, e a sedimentação das hemácias ocorre pela ação da gravidade. Ao contrário da metodologia manual em que o teste requer 1 ou 2h, a metodologia automatizada, dependendo do fabricante e do modelo do equipamento (Figura 8.8), varia de 8 a 20min para finalizar o teste.

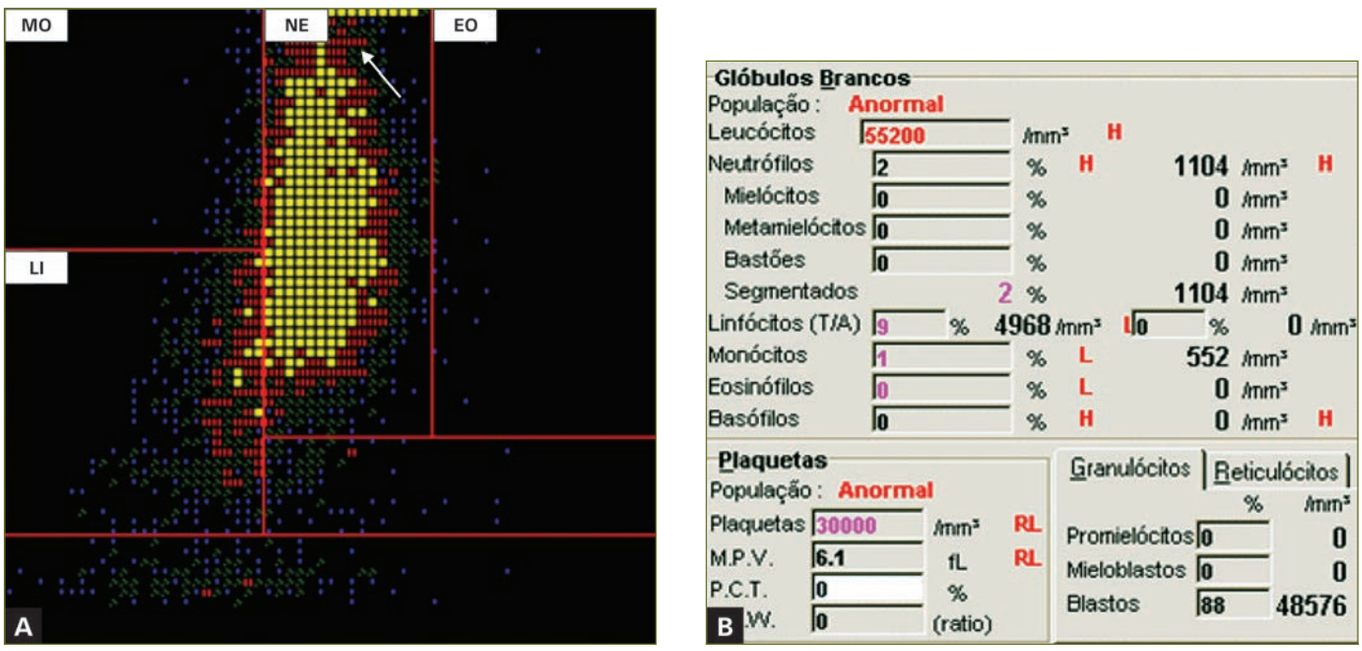


Figura 8.3 (**A** e **B**) Histograma e resultado enviados ao computador de um contador hematológico eletrônico do hemograma pertencente a um paciente com leucemia mieloide aguda. Observe a concentração de células imaturas na região superior (*seta branca*) do histograma de neutrófilos e o resultado liberado pelo citologista, após revisão da lâmina, com 55.200 leucócitos/mm^3, com 88% de blastos

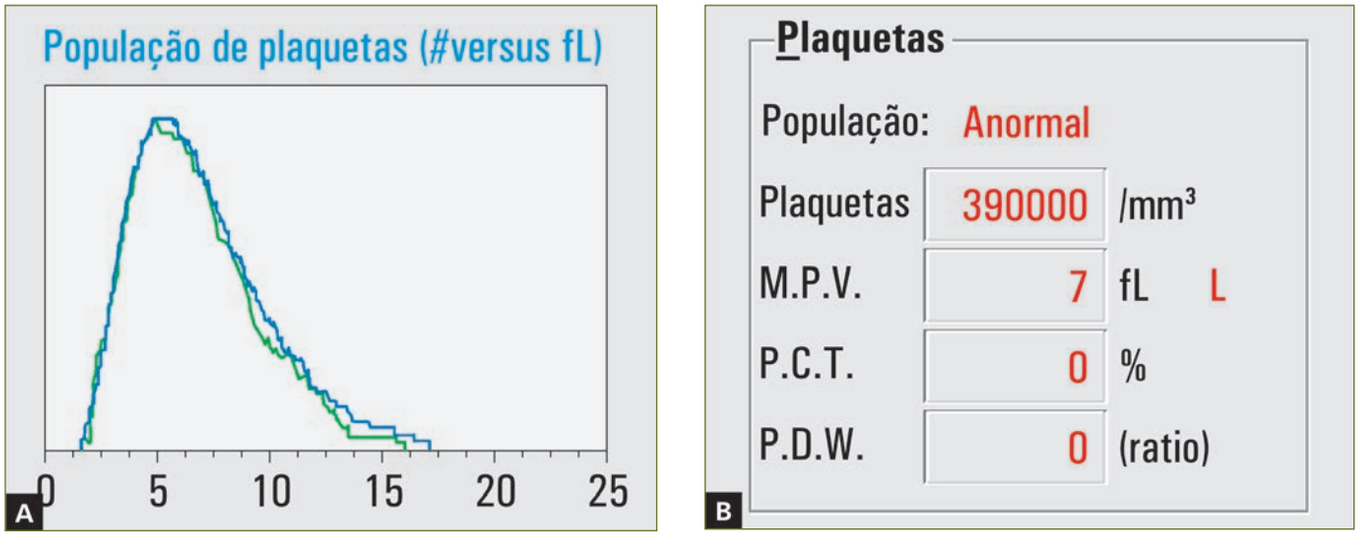


Figura 8.4 (**A** e **B**) Gráfico e resultado enviados pelo contador hematológico eletrônico referentes a população, contagem e tamanho das plaquetas

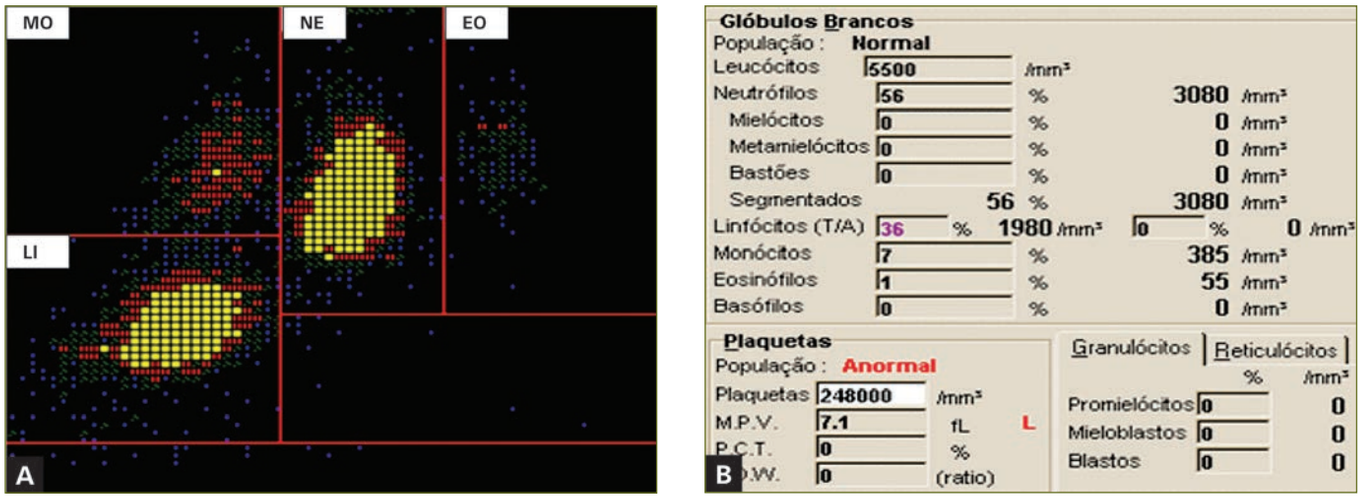


Figura 8.5 (**A** e **B**) Histograma e resultado enviado ao computador por um contador hematológico eletrônico de um hemograma normal

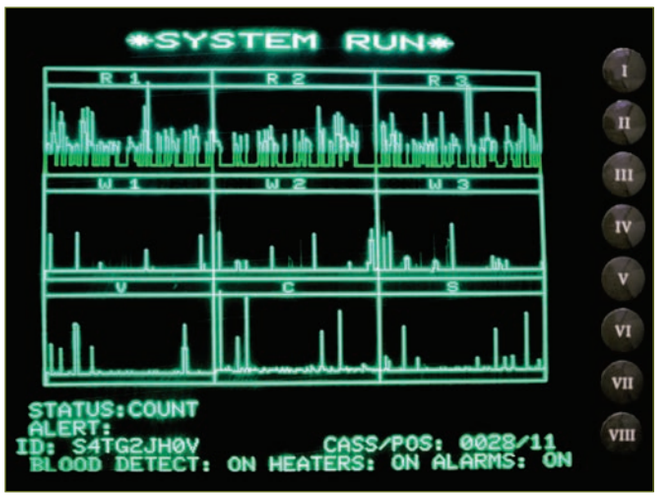


Figura 8.6 Osciloscópio executando a contagem das células

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Fotometria capilar, finalizada com o fluxo de análise cinética.

Linearidade: de 2 a 130mm.

RETICULÓCITO AUTOMATIZADO

A contagem de reticulócitos do sangue periférico é realizada para avaliar a integridade funcional da medula óssea. Entretanto, em pacientes com quadro de anemia que apresentam um número diminuído de reticulócitos na circulação ou reticulocitopenia, a eritropoese é ineficaz e pode estar associada a outros fatores. Além de avaliar a evolução desses pacientes, a contagem de reticulócitos promove a monitoração da

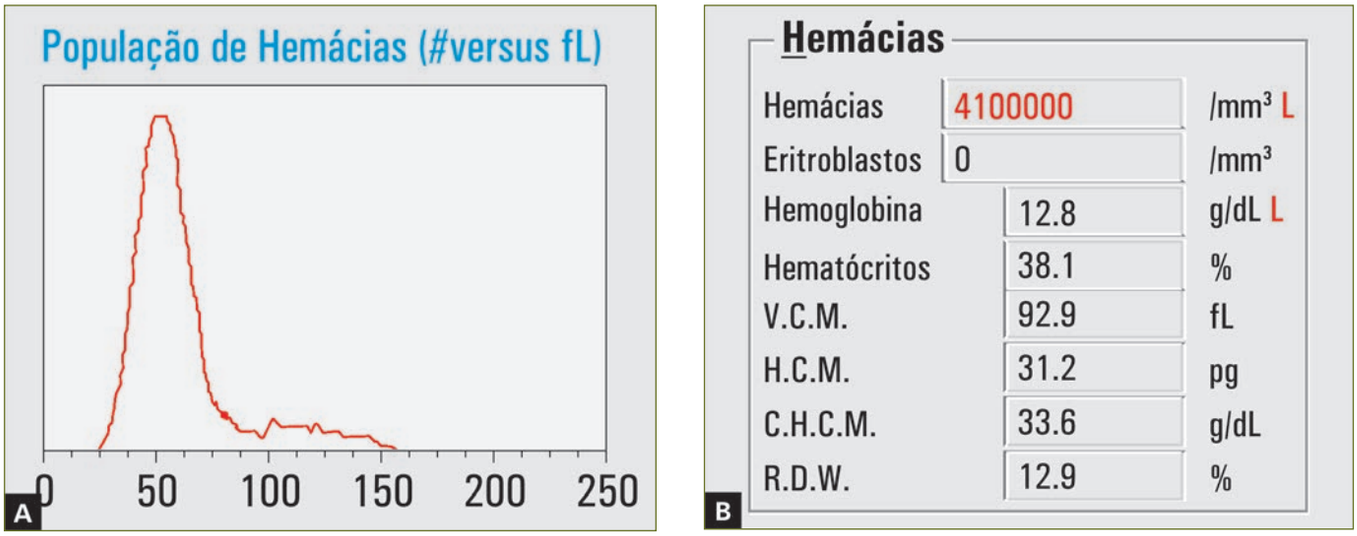


Figura 8.7 (**A** e **B**) Gráfico e resultado enviados pelo contador hematológico eletrônico da população e contagem das hemácias, com dosagem de hemoglobina, medição do hematócrito e índices hematimétricos

Figura 8.8 Máquinas de VHS automatizado

regeneração da atividade da medula óssea após quimioterapia ou transplante de medula óssea.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O equipamento utiliza uma solução especial do corante azul de metileno (reagente A) que é incubada com amostras de sangue total na mesma quantidade. Por sua vez, o corante precipita e agrega substâncias basofílicas (RNA e complexos ribossômicos) encontradas nos reticulócitos, que resulta em um padrão de coloração granular. O reagente B utilizado pelo equipamento remove a hemoglobina da célula vermelha, sem tirar o corante precipitado. A população total de células vermelhas é analisada por meio da tecnologia VCS (volume, condutividade, dispersão da luz). A impedância analisa dados sobre o tamanho da célula e a condutividade, os constituintes internos. Já a dispersão da luz ajuda a diferenciar os eritrócitos que contêm grânulos (reticulócitos) dos não granulares (população madura). O resultado é expresso na forma de gráfico de dispersão e porcentagem (Figura 8.9).

Valores normais

Adultos: 0,5% a 1,5% de reticulócitos.

FIBRINOGÊNIO AUTOMATIZADO

Utiliza-se o fibrinogênio automatizado (Figura 8.10) no diagnóstico diferencial de coagulopatias adquiridas, controle da coagulação intravascular disseminada e fibrinólise primária.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O fibrinogênio plasmático é quantificado no equipamento em presença de um excesso de trombina, no qual o tempo de coagulação de um plasma diluído (1/20) em proporções adequadas depende diretamente do nível de fibrinogênio plasmático. Alguns equipamentos utilizam o método calculado através do resultado do tempo de protrombina.

Linearidade: 15 a 1.200g/L.

AMOSTRA UTILIZADA

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasia. O sangue é centrifugado por 15min a 2.500bpm, velocidade e tempo suficiente para a formação do plasma pobre em plaquetas (PPP) no sobrenadante, com menos de 10.000 plaquetas/μL.

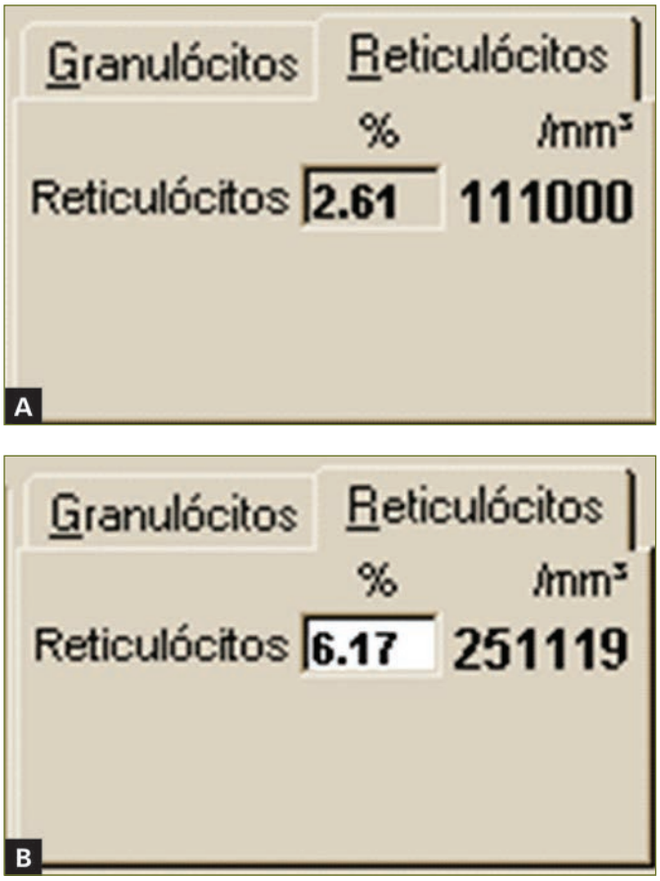


Figura 8.9 (**A** e **B**) Resultados automatizados do teste de reticulócitos liberados em contadores hematológicos eletrônicos

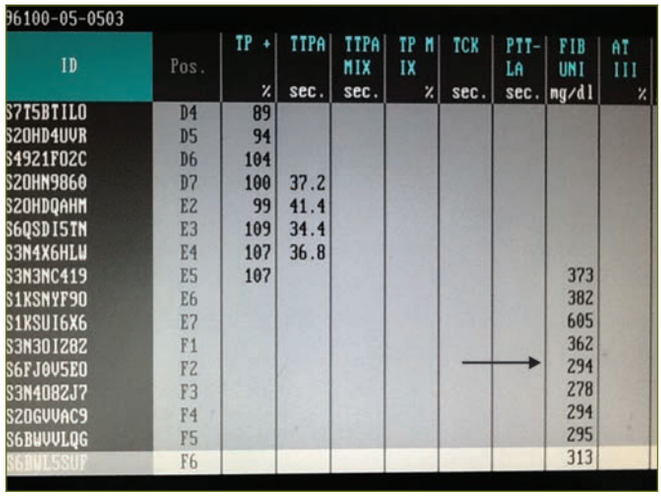


Figura 8.10 Resultados de fibrinogênio automatizados liberados pelo equipamento (*seta*)

PROTEÍNA C

A proteína C é encontrada no plasma sob a forma de proenzima que, para ser ativada, necessita de cálcio, trombina e fosfolipídios. Além disso, causa aumento da fibrinólise por inativação do inibidor da ativação do plasminogênio (PAI). A deficiência hereditária de proteína C leva ao estado de hipercoagulabilidade com aumento do risco de trombose venosa. A proteína C é um anticoagulante natural e utiliza a proteína S como cofator, mas é insensível aos déficits dessa proteína.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Realiza-se qualificação da proteína C no plasma em substrato sintético cromogêneo por método amidolítico, em aparelhos (Figura 8.11). Em presença do ativador específico, a proteína C do plasma é transformada em proteína C ativada. A quantidade de enzima formada é dosada pela sua atividade amidolítica sobre um substrato sintético. A libertação de paranitroanilina é medida no filtro de leitura de 405nm.

O intervalo de medição ou linearidade do método estende-se de 70% a 130%.

Figura 8.11 (**A** e **B**) Coagulômetros automáticos

AMOSTRA UTILIZADA

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasia. O sangue é centrifugado em velocidade e tempo suficiente para a formação do PPP no sobrenadante – a rigor, com menos de 10.000 plaquetas/μL. Centrifuga-se a amostra por 15min a 2.500rpm.

PROTEÍNA S

É uma proteína sintetizada no fígado, células endoteliais e megacariócitos. Está presente no plasma sob forma livre, funcionalmente ativa (40% do total) cumprindo função de cofator da proteína C, e na forma inativa (aproximadamente 60%) associada à proteína ligadora do C_4b do sistema complemento que não tem atividade anticoagulante. A proteína S é uma proteína vitamina K dependente, e sua deficiência congênita promove patologias da coagulação caracterizadas por sintomas de trombose venosa. A deficiência grave manifesta-se nos primeiros dias de vida com púrpura fulminante.

Os níveis de proteína S total e livre são mais baixos na mulher do que no homem. Além disso, na mulher, foram observadas variações em função do estado hormonal. Assim, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais em função de sua população e determine os valores a partir dos quais será necessário proceder a investigações suplementares. Durante a gravidez e uso de anticoncepcionais, observa-se uma diminuição do nível de proteína S livre.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Realiza-se quantificação antigênica da proteína S livre pelo método imunoturbidimétrico. Esta quantificação baseia-se no aumento da turvação de uma suspensão de micropartículas de látex, medida por fotometria. Ao colocar-se microesferas de látex, as quais se fixam por covalência a anticorpos monoclonais específicos da proteína S livre, em presença da proteína S livre do plasma a se testar. A reação antígeno-anticorpo desencadeia uma aglutinação destas microesferas. Tal fenômeno induz um aumento da turvação da mistura reacional e, portanto, uma elevação da absorvância do meio. A amplitude deste aumento depende da quantidade de proteína S livre contida no plasma testado.

O intervalo de medição do método estende-se de 10% a 150%.
Normalidade: 60% a 120%.

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasia.

ANTITROMBINA

Anteriormente conhecida como antitrombina III, a antitrombina é um anticoagulante natural, que inibe a trombina e os fatores X e XI ativados. Seu teste é utilizado na investigação de tromboembolismo venoso, estados de hipercoagulabilidade e monitoramento de resposta ao uso de heparina.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Realiza-se quantificação da atividade da antitrombina em substrato sintético cromogêneo por método amidolítico. A antitrombina exerce uma ação antitrombínica potente e imediata em presença da heparina. A quantificação é feita em duas etapas: incubação do plasma em presença da heparina e de uma quantidade fixa e em excesso de trombina; e medição da trombina residual pela sua atividade amidolítica no substrato cromogêneo (dosado a 405nm). A quantidade de trombina neutralizada é proporcional à quantidade de antitrombina presente no meio. A quantificação, não sendo influenciada pela heparina terapêutica, pode ser efetuada num indivíduo tratado com heparina.

Normalidade: geralmente, a taxa plasmática de antitrombina situa-se no adulto entre 80% e 120%.

AMOSTRA UTILIZADA

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasia. Centrifuga-se a 2.500rpm por 15min. O sangue é centrifugado em velocidade e tempo suficiente para a formação do PPP no sobrenadante – a rigor, com menos de 10.000.

ANTICOAGULANTE LÚPICO

Indica-se a pesquisa do anticoagulante lúpico plasmático em diversas condições clínicas que tenham em comum processos tromboembólicos recorrentes, como manifestações trombóticas neurológicas, abortos espontâneos sucessivos e trombose venosa e/ou arterial. O anticoagulante lúpico é um autoanticorpo da classe IgG ou IgM, presente em enfermidades autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide; na exposição a determinados fármacos; e em neoplasias, distúrbios mieloproliferativos, infecções virais e bacterianas. A determinação do tempo de cefalina+ativador (APTT) possibilita a detecção de anticoagulante de tipo lúpico. Dispositivos automatizados são utilizados para detecção no plasma de anticoagulante lúpico com a ajuda do tempo do veneno de víbora Russell diluído.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Consiste em determinar na presença de cefalina e do ativador, o tempo de recalcificação plasmática. A existência de anticorpos antifosfolipídicos traduz-se em um prolongamento deste tempo de coagulação. A sensibilidade do reagente possibilita acentuar especificamente o prolongamento devido ao anticoagulante lúpico.

O intervalo de medição do método estende-se de 20 a 180s.

TEMPO DE PROTROMBINA

O tempo de protrombina é muito utilizado no diagnóstico dos sangramentos, na monitorização terapêutica dos anticoagulantes orais e na avaliação de risco cirúrgico. O teste acompanha índices derivados do resultado do tempo de atividade da protrombina, como a atividade enzimática e o International Normalized Ratio (INR) – um índice internacional normalizado, que padroniza mundialmente os resultados do teste. Os pacientes que utilizam anticoagulantes orais são monitorados apenas pelo INR. O tempo de protrombina é um teste para avaliar a via extrínseca e a via comum da coagulação, ou seja, os fatores VII, X, V e o fibrinogênio.

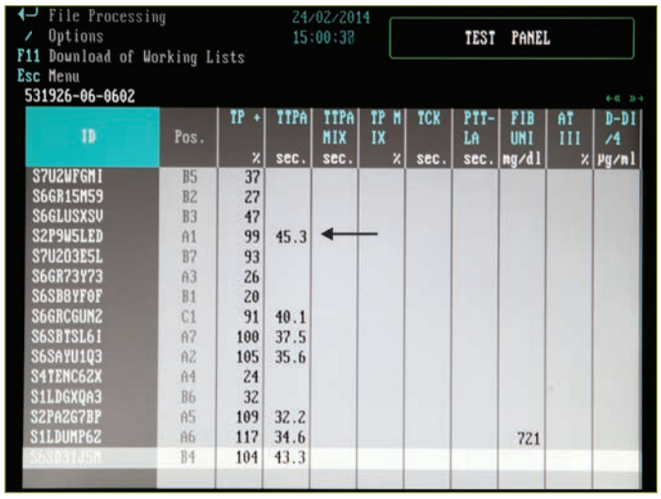
PRINCÍPIO DO MÉTODO

O princípio do teste é medir o tempo necessário para a formação de um coágulo de fibrina em uma amostra de plasma citratado após a adição de íons de cálcio e tromboplastina de tecido (fator III). O tempo de protrombina consiste em comparar, em presença de tromboplastina cálcica, o tempo de coagulação do plasma a estudar com a de um controle normal utilizado como referência (Figura 8.12).

Intervalo de medição: entre 5 e 60s.
Geralmente, os valores normais variam de 11 a 14s.

AMOSTRA UTILIZADA

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasia. O sangue é centrifugado em velocidade e tempo suficiente para a formação do PPP no sobrenadante – a rigor, com menos de 10.000 plaquetas/μL. Devem-se evitar grandes variações de temperatura: o resfriamento ativa o fator VII e o aquecimento inativa os fatores V e VIII.



ID	Pos.	TP + %	TTPA sec.	TTPA MIX sec.	TP M IX %	TCK sec.	PTT-LA sec.	FIB UMI mg/dl	AT III %	D-DI /4 µg/ml
S7U2WFGMI	B5	37								
S6GR15M59	B2	27								
S6GLUSXSV	B3	47								
S2P9W5LED	A1	99	45.3	←						
S7U2D3E5L	B7	93								
S6GR73Y73	A3	26								
S6SB8YF0F	B1	20								
S6GRCGUN2	C1	91	40.1							
S6SBTSL6I	A7	100	37.5							
S6SAYU1Q3	A2	105	35.6							
S4TEMC62X	A4	24								
S1LDGXQA3	B6	32								
S2PA2G7BP	A5	109	32.2							
S1LDUMP6Z	A6	117	34.6					721		
[illegible]	B4	104	43.3							

Figura 8.12 Resultados de tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada fornecidos pelo coagulômetro automático (*seta*)

TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

O tempo de tromboplastina parcial ativada é utilizado na detecção de deficiências ou na presença de inibidores de fatores da coagulação da via intrínseca ou comum. É o teste de escolha para monitoramento da terapia de anticoagulação com heparina. Também são sensíveis os produtos de degradação da fibrina. É o teste indicado, junto com o tempo de protombina, para a investigação das causas de hemorragias e nas rotinas pré-operatórias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Baseia-se no tempo de recalcificação plasmática em presença de cefalina (substituto plaquetário) e de um ativador de partículas (silício) não sedimentar. Dessa maneira, avalia os fatores XII, XI, IX, VIII, II e I.

Intervalo de medição: entre 20.00 a 300.00s.
Valores normais geralmente variam de 30 a 40s.

TEMPO DE TROMBINA

O teste é utilizado para determinar hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia e hepatopatias. Além disso, monitora a resistência à heparina e o diagnóstico da coagulação intravascular disseminada, em que ocorre intenso consumo de fibrinogênio. É um teste para detectar deficiências no fibrinogênio.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O princípio do teste é medir o tempo da formação do coágulo após acrescentar uma concentração padrão de trombina no plasma do paciente a ser avaliado. Para realizar o teste, necessita-se da taxa de formação da fibrina. O plasma do paciente é diluído e o fibrinogênio torna-se um fator limitante na formação do coágulo quando a trombina é aderida.

Intervalo de medições: entre 13 e 240s.
Geralmente, os valores normais variam de 12 a 18s.

D-DÍMERO

A dosagem do D-dímero pode ajudar o diagnóstico de exclusão da trombose venosa profunda e/ou da embolia pulmonar. Existem outros fragmentos derivados da fibrina monomerizada, mas o dímero D é específico para a fibrina degradada após a polimerização, o que qualifica seu uso como marcador de fibrinólise de coágulo.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Esta quantificação baseia-se no aumento da turvação de uma suspensão de micropartículas de látex, medida por

fotometria. As microesferas de látex, sobre as quais se fixam por covalência anticorpos monoclonais específicos do D-dímero, formam a reação antigêno-anticorpo provocando uma aglutinação dessas microesferas. Tal fenômeno induz um aumento da turvação da mistura reacional e, como tal, uma elevação da absorvância do meio. A amplitude desse aumento depende da quantidade de D-dímero contido no plasma testado.

Valor de referência: <0,5mg/mL.

Intervalo de medição: de 0,22 a 10,0µg/mL.

AMOSTRA UTILIZADA

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasia.

9

Técnicas Especiais

CITOGENÉTICA

As anormalidades nos genes que regulam o ciclo celular podem levar a proliferação celular maligna. Ou seja, a perda da regulação das etapas do ciclo celular provoca acúmulos de células com defeitos genéticos que as tornam instáveis e com probabilidade de concentrar outros fatores hereditários que talvez levem as células à malignidade. Assim, observa-se sempre a perda do equilíbrio entre a apoptose e a proliferação nos processos malignos.

MÉTODOS PARA DETECTAR OS MECANISMOS DE LESÃO GENÉTICA NO CÂNCER

Análise de DNA – reação em cadeira da polimerase

O método de diagnóstico molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR), ou reação em cadeia da polimerase, é uma análise altamente específica de amplificação (criação de múltiplas cópias) de segmentos selecionados de DNA. Essas sequências, ou lócus, podem ser específicas de determinado organismo, genes mutantes ou fatores de patogenicidade. Desse modo, a PCR pode ser aplicada como ensaios de mutações conhecidas. Pequenas deleções e inserções em alelos podem ser detectados por este método. Um exemplo são as deleções no alelo mais comum que causa a fibrose cística (DF508).

O rastreamento de mutações e polimorfismos de DNA é mais uma aplicação da PCR. A detecção de variações de sequências no DNA é importante para a identificação de mutações que causam doenças em um determinado gene.

A RT-PCR (PCR em tempo real) é uma variante da reação PCR convencional que utiliza a enzima transcriptase reversa na sua reação. Assim, esse tipo de PCR amplifica o DNA com base no RNA (o molde é o RNA). É também um grande auxílio nos métodos moleculares de diagnóstico das doenças onco-hematológicas, identificando, por exemplo, a elevada expressão do transcrito BCR-ABL, translocação presente em 95% dos pacientes com leucemia mieloide crônica.

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é um processo de localização de antígenos em células de uma amostra de tecido. A coloração imuno-histoquímica é amplamente utilizada para: determinar o órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; a subtipagem de neoplasias (linfomas); o tecido de origem de uma neoplasia morfologicamente indiferenciada; e os fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias.

Duas estratégias são usadas para a detecção imuno-histoquímica de antígenos nos tecidos: os métodos direto e indireto. O direto envolve apenas um anticorpo marcado, sendo método de coloração de apenas um passo – portanto, é simples e rápido. Contudo, é menos utilizado do que os métodos indiretos.

No método indireto de imuno-histoquímica, é necessário primeiro um anticorpo não marcado que reaja com o antígeno do tecido. Logo após, adiciona-se um anticorpo secundário marcado que reaja com o anticorpo primário. Este método é mais sensível que o direto. Ao contrário da imunocitoquímica, o tecido não precisa ser hipermeabilizado, pois isso já ocorreu na lâmina do micrótomo durante a preparação da amostra.

FISH

É um estudo citogenético molecular das alterações cromossômicas, por técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). Esta técnica possibilita identificar uma sequência-alvo de ácido ribonucleico, por meio do uso de uma sonda. O princípio básico é o anelamento específico entre as duas

sequências. É um método sensível e quantitativo para a detecção de aberrações cromossômicas específicas, não só em células em divisão, mas também em interfases.

O FISH é um procedimento rápido, tendo em vista que, após algumas horas de hibridação, faz-se a contagem de células. Enquanto isso, após a cultura, a citogenética clássica necessita de alguns dias para passar à análise das metáfases. Este método é extremamente sensível e apresenta uma grande especificidade. Com ele, também podem ser analisadas centenas de células em um único experimento. A FISH apresenta várias indicações na hematologia: monitoração pós-transplante de medula óssea, leucemia mieloide crônica, leucemia linfoide crônica, leucemia mieloide aguda e leucemia linfoide aguda (o FISH é extremamente útil para identificar as leucemias com cromossomos Ph, que implicam tratamento diferenciado).

IMUNOFENOTIPAGEM

A introdução de anticorpos monoclonais para identificar os antígenos de membrana nucleares ou citoplasmáticos trouxe um grande progresso para a classificação das doenças hematológicas. Hoje, existem mais de 200 marcadores fenotípicos de células hematopoéticas classificados pela nomenclatura *cluster differentiation* (CD) (em português, significa "conjunto de diferenciação"). Assim, eles identificam os antígenos que são evidenciados pelos anticorpos monoclonais. Esta técnica com anticorpos monoclonais pode ser realizada por imunocitoquímica ou por imunofluorescência.

Na imunocitoquímica, os anticorpos monoclonais estão conjugados a enzimas e identifica-se a reação antígeno-anticorpo pela produção de compostos coloridos. Esta técnica possibilita a avaliação imunofenotípica e morfológica, além de ser aplicada também nos tecidos.

Na imunofluorescência, os anticorpos monoclonais estão conjugados a fluorocromos que, a partir de uma excitação por um feixe luminoso (feixe de *laser*), produzem ondas de comprimentos diversos (luminescência) em várias cores. A imunofluorescência pode ser feita em células fixadas a uma lâmina, chamada técnica *in situ*, ou por meio de um fluxo laminar de células em suspensão – a chamada citometria de fluxo.

CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é o método preferencial para a imunofenotipagem das doenças hematológicas malignas, podendo evidenciar antígenos que determinam a linhagem celular, as fases de maturação celular, a análise da clonalidade e a monitoração do tratamento com pesquisa da doença residual mínima. Os materiais mais preferidos pela imunofenotipagem por citometria de fluxo são os aspirados de medula óssea e sangue periférico. Além disso, são necessárias a lise das hemácias antes da leitura e a separação das células por densidade (*Ficoll-Paque*), técnica que concentra mononucleares. Esta é também utilizada quando há investigação celular específica.

Na pesquisa de antígenos intracelulares, no citômetro de fluxo (Figura 9.1), é feito um tratamento permeabilizador da membrana celular antes da incubação com os anticorpos monoclonais conjugados. As análises obtidas pela citometria de fluxo são representadas por meio de histogramas e gráficos de pontos (Figura 9.2), nos quais se observa o tamanho e a granulosidade celular além das populações de linfócitos, monócitos, granulócitos, células plasmáticas e células blásticas.

Figura 9.1 Citômetro de fluxo

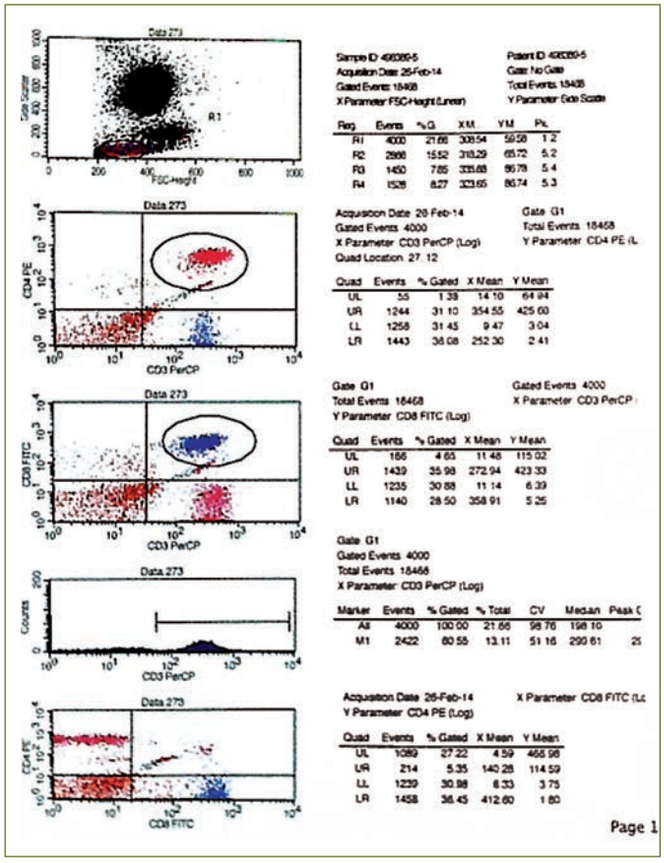


Figura 9.2 Resultado das populações de leucócitos estudadas na citometria de fluxo

MARCADORES IMUNOFENOTÍPICOS

Marcadores da linhagem B

A célula B tem na membrana celular moléculas de imunoglobulinas e isso é sua maior característica. Também pode expressar apenas uma cadeia leve de imunoglobulina em todas as células neoplásicas (imunoglobulina monoclonal). Os antígenos CD19, CD22 e CD79b são vistos como antígenos de diferenciação B, pois são expressos pela maioria dos linfócitos B e seus precursores. O CD10 é um antígeno comum na LLA e encontrado na maioria das leucemias linfoides agudas infantis, porém pode ser visto nos linfomas não Hodgkin do tipo folicular. Outros antígenos importantes para classificação da linhagem B são:

- CD5.
- CD103.
- CD23.

Marcadores da linhagem T

O receptor de membrana de células T (TcR) está associado ao CD3 na membrana celular. Considera-se o antígeno CD3 um indicativo da linhagem T. As células T imaturas expressam o antígeno CD7 que também podem ser detectadas nas células precursoras da linhagem mieloide. No timo, os timócitos CD3+ coexpressam os antígenos CD4+ e CD8+, enquanto os linfócitos T no sangue periférico são CD4+ ou CD8+. As células exterminadoras naturais (NK) expressam os antígenos CD56, CD57 e CD16. Outros marcadores importantes da linhagem T são:

- CD5.
- CD25.
- CD2.

Marcadores mieloides

Os mieloides são marcadores que acompanham as maturações granulocítica, monocítica, megacariocítica e eritroide. Tais marcadores estão em menor número do que os marcadores linfoides. A mieloperoxidase (MPO) é o critério mais importante para a identificação da linhagem mieloide. A MPO pode ser identificada pelos métodos citoquímico e imunofenotípico, mas ela não é expressa nas LMA M5, M6 e M7.

Os antígenos CD33 e CD13 são expressos pela maioria das células da linhagem mieloide, sendo conhecidos como antígenos pan-mieloides. Os antígenos CD14 e CD11b estão associados à linhagem monocítica e o antígeno CD15, à linhagem granulocítica.

A glicoforina é expressa nas células da linhagem eritroide. Já os antígenos CD42a e CD61 evidenciam a linhagem megacariocítica e o HLA-Dr é encontrado na LMA M-3.

Com base nos marcadores presentes nas células neoplásicas, é possível classificá-las como:

- LLA pró-B.
- LLA comum (CALLA positivo).
- LLA pré-B com presença de imunoglobulina intracitoplasmática.
- LLA B madura (com imunoglobulinas de superfície).
- LLA pró-T.
- LLA pré-T.
- LLA T madura (CD4+ ou CD8+).
- LMA (doenças linfoproliferativas crônicas).

CITOQUÍMICA

Diversas patologias, particularmente as hematológicas, podem ser investigadas por meio da coloração citoquímica. Assim, esta consiste em um valioso procedimento para o diagnóstico das leucemias e linfomas. Métodos de procedimentos protocolares promovem coloração de tecidos e constituintes celulares para serem avaliados ao microscópio.

A citoquímica tem como princípio detectar enzimas intracelulares que catalisam várias reações e outras substâncias específicas para um determinado tipo celular. A adição de pseudossubstratos demonstra a atividade destas enzimas. A atividade e a localização enzimática das células malignas são diferentes, quando comparadas aos componentes das células normais.

Embora novas técnicas de identificação celular sejam cada vez mais precisas e confiáveis, a citoquímica ainda é importante, sendo utilizada nos centros hematológicos para ajudar na identificação celular. A classificação franco-americano-britânica (FAB) acredita que a coloração citoquímica é extremamente útil para identificar leucemias agudas, principalmente as indiferenciadas. A seguir, são apresentadas as principais colorações citoquímicas.

REAÇÃO DE SUDAN BLACK

A reação de Sudan Black (Figura 9.3) é positiva para leucemias mielocíticas e mielomonocíticas e negativa para leucemias linfocíticas e outros tipos de leucemias monocíticas. Geralmente, os mieloblastos normais são negativos. As séries eritroide e megacariocítica também são negativas para esta coloração. A reação de Sudan Black B detecta lipídios intracelulares, principalmente fosfolipídios de membrana.

MIELOPEROXIDASE

A MPO é uma enzima encontrada nos microssomos das células hepáticas, renais, nos grânulos azurófilos primários das células mieloides e células monocitárias. Os blastos primitivos demonstram atividade de peroxidase em áreas como a região de Golgi e o retículo endoplasmático. A MPO é positiva para leucemias mielocíticas e mielomonocíticas (Figura 9.4), e negativa para leucemias linfocíticas e monocíticas.

ESTERASE INESPECÍFICA – ALFANAFTIL ACETATO

É utilizada principalmente para medir o grau do componente monocítico na leucemia aguda mielomonocítica. Contudo, a leucemia megacarioblástica e algumas neoplasias de célula T podem apresentar positividade focal. Encontra-se esta enzima em várias células da medula óssea e do sangue periférico. A intensidade da coloração citoquímica tem valor para identificar

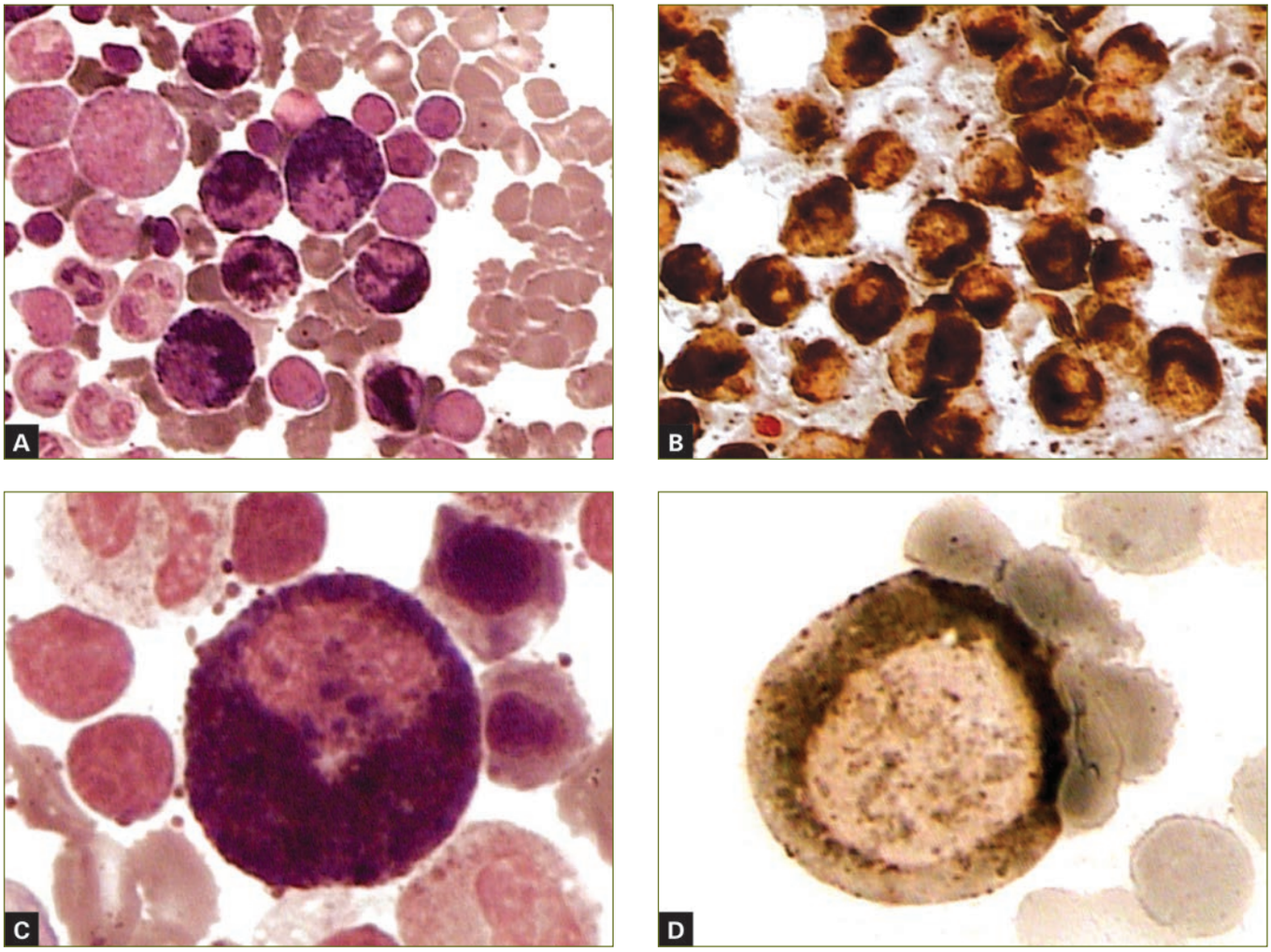


Figura 9.3 (**A** a **D**) Sudan Black positivo: leucemia mielomonocítica aguda (2.000×)

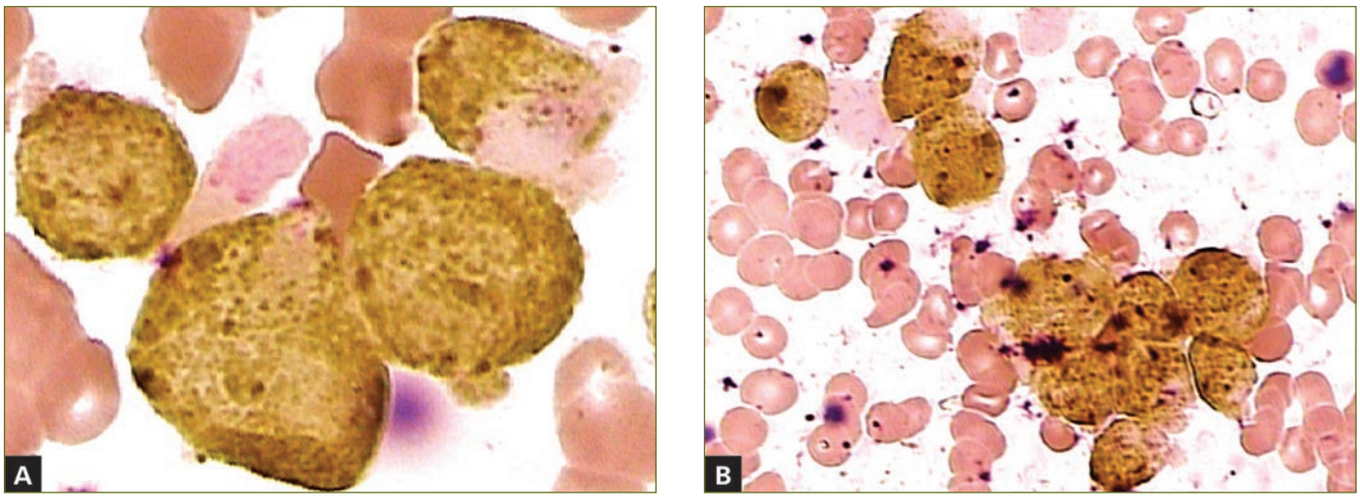


Figura 9.4 (**A** e **B**) Mieloperoxidase positiva: leucemia mieloide aguda – promielocítica - LMA M3 (2.000×)

as células da linhagem monocítica que apresentam alta positividade.

ESTERASE INESPECÍFICA – ALFANAFTIL BUTIRATO

As características tintoriais são as mesmas da enzima esterase inespecífica – alfanaftil-acetato, diferenciando apenas pela negatividade nos megacariócitos. Ela possibilita o diagnóstico diferencial das leucemias megacarioblásticas.

DESOXINUCLEOTIDIL-TRANSFERASE--TERMINAL

É um marcador para a população linfoide primitiva. A enzima é derivada do núcleo, sendo encontrada em células pré-B e linfoblastos T, porém ausente em linfócitos B maduros. A atividade da TdT no núcleo é indicada pela presença de fluorescência na célula. Recomenda-se para o diagnóstico de LLA de células T, pré-B e linfomas.

REAÇÃO DO ÁCIDO PERIÓDICO-SCHIFF (PAS)

Os neutrófilos reagem fortemente em todos os estágios de desenvolvimento celular a esta coloração. No entanto, a reação é mais forte nos neutrófilos mais maduros. As células blásticas mieloides apresentam apenas resíduos de glicogênio, começando a concentrar a partir dos promielócitos. Os monócitos e os linfócitos apresentam reações fracas ou pálidas. A reação detecta aldeído resultante da oxidação pelo ácido periódico que, em presença do reativo Schiff, forma composto intracelular de cor magenta. A PAS reage com depósitos citoplasmáticos de carboidratos, mucopolissacarídeos e glicoproteínas.

FOSTATASE ÁCIDA

A fosfatase ácida é aplicada no diagnóstico da tricoleucemia e das neoplasias de linhagem T. As células da tricoleucemia apresentam fosfatase ácida resistente ao tartarato, enquanto as células da neoplasia de linhagem T exibem forte positividade focal.

FOSFATASE ALCALINA DE NEUTRÓFILOS

Esta enzima está localizada em maior quantidade nos neutrófilos no estágio segmentado. Apresenta aumento da sua atividade em infecções, doença de Hodgkin e mielofibrose. Observa-se a diminuição da atividade nas LMA, uma hemoglobinúria paroxística noturna e nas mononucleoses. A interpretação é feita utilizando-se uma escala de intensidade de graduação de cruzes de 0 a 4. Geralmente, pacientes com leucemia mieloide crônica apresentam escore baixo.

Laboratorio de Hematologia - cap-09.indd 240 24/09/2014 10:24:53

10

Princípios Básicos da Onco-hematologia

QUIMIOTERAPIA

Após um acidente com gás mostarda durante a Segunda Guerra Mundial, vários marinheiros norte-americanos desenvolveram hipoplasia medular. Este efeito citotóxico foi usado primeiramente com sucesso em 1942 em tratamentos de câncer com a mostarda nitrogenada. Outros agentes quimioterápicos também foram descobertos por acaso, como o alcaloide de vinca, os derivados de platina e as epipodofilotoxinas.

Os agentes antineoplásicos têm como ação central a apoptose celular, que interfere em alguma fase essencial da divisão celular. O objetivo é reduzir a população de células tumorais a zero.

As fases do ciclo celular iniciam-se por meio de estímulos bioquímicos de ativação e inativação de proteínas específicas sincronicamente. As fases são as seguintes:

- **G0**: fase de repouso, fora do ciclo.
- **G1**: interfase – síntese de proteínas, RNA e DNA.
- **S**: duplicação do DNA.
- **G2**: termina a produção de DNA e começa a de precursores do sistema microtubular.
- **M**: mitose – no término dessa fase, a célula volta às fases G0 e G1.

Durante as fases G1 a S, a célula determina se irá prosseguir ou parar o processo de apoptose. Na entrada da fase S, é necessária a ativação de várias enzimas denominadas cinases dependentes das ciclinas (CDK) que ativam as ciclinas que é um grupo de enzimas necessárias para a síntese de DNA. Quando as células são lesionadas pelos agentes quimioterápicos e não são capazes de reparar o dano, o processo de apoptose é iniciado na transcrição G1 a S. As proteínas p53 e p21 são os principais componentes no processo de apoptose, inativando as ciclinas e impedindo a progressão da fase S.

PRINCIPAIS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS POR TIPO DE AÇÃO

Os agentes quimioterápicos agem de forma diferente na apoptose celular. Os agentes que lesionam o DNA ou alquilantes, adicionam um grupo alquila ao DNA celular, evitando a sua duplicação. Os agentes antimitóticos agem sob os microtúbulos do fuso mitótico, impossibilitando a célula de se dividir, e os agentes antimetabólicos são substâncias com estruturas similares aos metabólitos necessários para reações bioquímicas normais, inibindo as funções celulares.

Agentes que lesionam o DNA

- Introdução de radical alquila (mostarda nitrogenada, bussulfano, clorambucila etc.).
- Ligação cruzada de resíduos de platina.
- Inibição de topoisomerase II.
- Inibição de topoisomerase I.
- Oxidação de DNA.

Agentes que interferem no fuso mitótico

- Alcaloide de vinca.
- Texanos.

Antimetabólicos

- Ribonucleotídio redutase (hidroxiureia).
- Timidilato sintetase.
- Di-idrofolato redutase.
- DNA polimerase.
- Adenosina-desaminase.

PRINCIPAIS NEOPLASIAS TRATADAS COM AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

- Coriocarcinoma.
- Doença de Hodgkin.
- Leucemia linfoide aguda.
- Leucemia mieloide aguda.
- Linfoma não Hodgkin (alguns tipos).
- Tricoleucemia.
- Tumores germinativos do testículo.
- Carcinoma de ovário.
- Carcinoma de pulmão de pequenas células.

RADIOTERAPIA

A radioterapia tem como mecanismo básico de ação a morte celular pelo processo de apoptose. Como as células normais têm um processo mais rápido de reparo celular que as células neoplásicas, a clínica utiliza este fato para aplicar doses de radiação fracionadas e separadas por intervalos de horas, assim lesando bem mais as células neoplásicas que as normais.

O tratamento locorregional da neoplasia visto na radioterapia preserva todos os demais tecidos normais do paciente. Com o tratamento radioterápico, observa-se uma ótima resposta nos linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, podendo chegar a cura completa da doença.

A associação da radioterapia à quimioterapia é bastante usada em alguns tratamentos.

Embora o alvo da radioterapia seja o DNA, a membrana celular também sofre o efeito da radiação ionizante que forma oxigênio molecular e radicais livres, os quais são fundamentais para a maior letalidade celular.

As radiações podem ser eletromagnéticas (raios X e raios gama) ou corpusculares (elétrons, prótons, nêutrons e partículas alfa). A radioterapia utiliza fontes de radiação para fins terapêuticos, como:

- **Aceleradores lineares**: produzem raios X.
- **Bombas de cobalto**: produzem raios gama a partir de cobalto ou césio.

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

A infusão de células-tronco após quimioterapia de altas doses é uma estratégia terapêutica com a finalidade de cura de várias neoplasias hematológicas e tumores sólidos. Esta estratégia é conhecida como transplante de medula óssea e divide-se em três tipos:

- **Transplante autólogo**: a medula óssea ou as células-tronco periféricas são retiradas do próprio paciente, criopreservadas e reinfundidas após regime de acondicionamento. As células são coletadas após quimioterapia não tão intensa. O transplante de medula autólogo é utilizado em pacientes com até 70 anos de idade.
- **Transplante alogênico**: a medula óssea é retirada de um doador selecionado anteriormente por teste de histocompatibiliade (HLA compatível). Geralmente, os pacientes doadores fazem uso do fator estimulador da população granulocítica. Os doadores costumam ser familiares do paciente ou identificados em bancos de medula óssea. O receptor de medula óssea do tipo alogênico deve ter, no máximo, 60 anos de idade.
- **Transplante singênico**: é feito entre irmãos gêmeos univitelinos.

A realização do transplante de medula óssea consiste na retirada da medula óssea da crista ilíaca posterior do doador por meio de numerosas aspirações por agulhas especiais para este procedimento. A quantidade de medula óssea necessária recomendada para o transplante é 10mL de medula óssea para cada quilograma do paciente. Por exemplo: um paciente com 80kg necessita de 800mL de medula óssea para o transplante. O transplante também pode ser feito com células-tronco periféricas estimuladas e depois separadas em máquina de aférese.

Após a infusão, as células transplantadas alojam-se na medula óssea por mecanismo de tropismo, mediado por citocinas. Estas células fenotipicamente são CD34+ e têm alta capacidade de proliferação. Durante aproximadamente 3 semanas após a infusão da medula óssea, o paciente permanece em aplasia medular intensa, enquanto não ocorre a enxertia. Logo após esse período, a contagem de leucócitos aumenta, confirmando a recuperação medular. Geralmente, quando há falha na enxertia, o número de neutrófilos é inferior a 500 células/mm^3 no vigésimo primeiro dia após a infusão da medula óssea.

No transplante de células-tronco periféricas, o doador recebe um estimulador para a população granulocítica (filgrastima) por injeção durante cinco dias antes da doação. Pelo processo de aférese, as células são coletadas durante um período de 4 a 6h. Cerca de 5% a 10% dos doadores não têm veias apropriadas para o procedimento de aférese.

Alguns grupos de doenças são indicados para transplante de medula óssea:

- **Doenças onco-hematológicas**:
  - Leucemias agudas.
  - Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin.
  - Síndromes mielodisplásicas.
  - Leucemia mieloide crônica.
  - Mieloma múltiplo.
- **Doenças do sistema imunológico**:
  - Anemia de Fanconi.
  - Anemia aplástica grave.
  - Hemoglobinopatias.
  - Imunodeficiência combinada grave.
  - Síndrome de Wiskott-Aldrich.
- **Doenças oncológicas**:
  - Tumor de mama.
  - Tumor de ovário.
  - Tumor de testículos.
  - Neuroblastoma.
  - Outros tumores sólidos.

O transplante com sangue de cordão umbilical apresenta uma alta concentração de células tronco CD34+, em torno de

68% do total de células do material. Contudo, o volume máximo coletado geralmente é de apenas 80 a 100mL de sangue do cordão umbilical. Enquanto isso, a medula óssea contém apenas 11% destas células. O sangue do cordão umbilical apresenta baixa quantidade de linfócitos e leva apenas 15min em média para ser coletado.

Além disso, sua utilização é mais restrita e o paciente deverá ter, no máximo, 50kg de peso, para poder receber o transplante com sangue de cordão umbilical. Este transplante apresenta uma enxertia mais demorada.

Quando o complexo maior da histocompatibiliade (HLA classe I) é compatível entre doador e receptor no transplante de medula óssea, mesmo assim pode haver rejeição, devido à atividade de outros antígenos. A percentagem de compatibilidade total entre medulas ósseas de irmãos é de 25%, e pacientes com apenas 50% de compatibilidade de medula óssea são denominados haploidênticos. A incompatibilidade do grupo sanguíneo ABO não impede o transplante, já que o paciente adquire o grupo sanguíneo do doador.

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) surge quando a nova medula fabrica anticorpos contra o receptor. Os primeiros sinais surgem na terceira semana após o transplante: rubor e sensação de calor na palma da mão e planta dos pés. Bolhas e feridas também podem surgir na pele e na boca. Quando o fígado é atingido, observa-se icterícia. Já no trato digestivo, provoca náuseas, vômitos e diarreia. É uma complicação do transplante de medula óssea alogênico. É menos frequente em pacientes com menos de 20 anos de idade.

As principais causas de DECH são:

- Disparidade do HLA.
- Idade avançada.
- Sexo diferente entre doador e receptor.
- Transplante alogênico.

A DECH apresenta ótimos resultados com o tratamento com corticoide, ciclosporina e imunossupressor. Entretanto, o surgimento da doença evita completamente sua recidiva e ajuda a manter a enxertia.

No transplante de medula óssea, as principais causas de morte são:

- **Aparentados**:
  - *Recidiva*: 34% dos casos.
  - *Infecção*: 17% dos casos.
  - *DECH*: 15% dos casos.
  - *Toxicidade*: 14% dos casos.
- **Não aparentados**:
  - *Recidiva*: 23% dos casos.
  - *Infecção*: 21% dos casos.
  - *DECH*: 15% dos casos.
  - *Toxicidade*: 15% dos casos.
- **Autólogos**:
  - *Recidiva*: 78% dos casos.
  - *Infecção*: 7% dos casos.
  - *Toxicidade*: 5% dos casos.

ESTIMULADORES DA POPULAÇÃO GRANULOCÍTICA

É importante chamar a atenção para pacientes que fazem uso destas medicações, devido às alterações morfológicas e quantitativas nos granulócitos que elas causam. Embora na prática a intensidade das reações varie entre os pacientes, sempre se observa estimulação da população granulocítica. As medicações mais usadas hoje para estimular os granulócitos são a timomodulina e a filgrastima.

TIMOMODULINA

A timomodulina é um estimulador da população dos leucócitos, é um composto obtido do lisado ácido de timo de vitelo, produzindo um purificado rico em polipeptídeos, exercendo uma modulação tanto sobre a medula óssea como sobre o sistema imunológico. O extrato tímico (timomodulina) tem um efeito estimulador menor que a filgrastima.

FILGRASTIMA

Forte estimulador da população dos granulócitos, a filgrastima é um fármaco injetável que provoca, logo após quatro horas de sua aplicação, as primeiras respostas mieloides na medula óssea. No sangue periférico, observa-se frequentemente a reversão de um quadro de evidente leucopenia para um quadro de leucocitose em 24h. São comuns granulações grosseiras atípicas, alterações morfológicas e células imaturas (Figuras 10.1 e 10.2).

Essa medicação é indicada para pacientes neutropênicos com neoplasias não mieloides sob quimioterapia citotóxica; e em tratamento de síndromes mielodisplásicas, neutropenia crônica grave ou neutropenia induzida por fármacos. Há aceleração da recuperação de enxerto mieloide em pacientes com linfoma não Hodgkin (Figura 10.3), leucemia linfoblástica aguda e doença de Hodgkin que sofreram transplante autólogo da medula óssea.

No conhecimento do uso da medicação, convém não valorizar as alterações morfológicas causadas pela filgrastima.

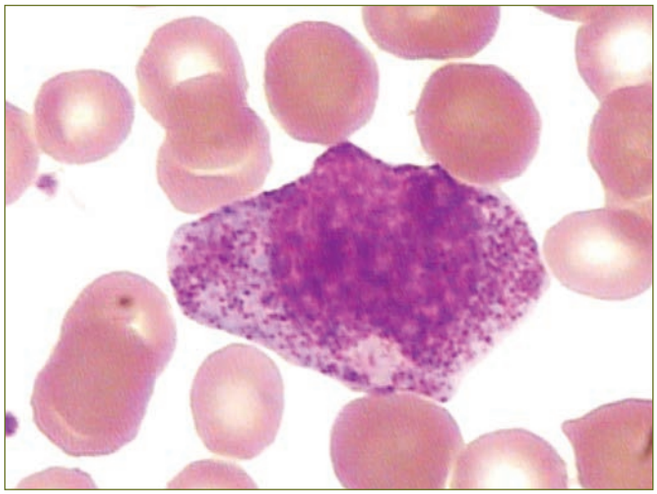


Figura 10.1 Granulócito com granulações atípicas após uso da filgrastima (2.000×)

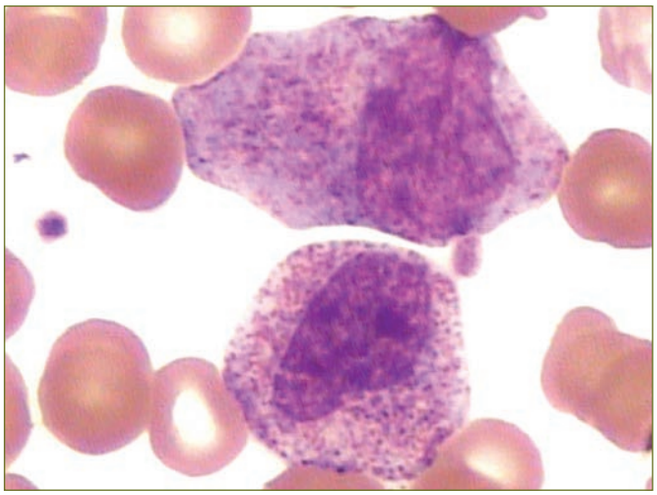


Figura 10.2 Granulócitos com granulações atípicas após uso da filgrastima (2.000×)

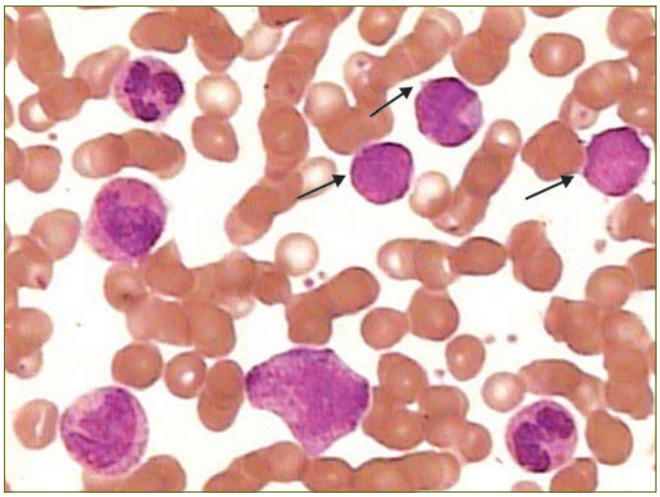


Figura 10.3 Granulócitos com granulações atípicas após uso da filgrastima e três células linfoides (*setas*), no tratamento do linfoma de células do manto (2.000×)

11

Destaques e Curiosidades

MITOSE

Nas leucemias agudas, ocorre uma acentuada proliferação celular na medula óssea. É comum as células leucêmicas, principalmente as mieloides, apresentarem-se em forma de figuras de mitose em todas as fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 11.1). Em algumas leucemias agudas, tais figuras podem ser observadas até no sangue periférico.

BASTONETES DE AUER

Os bastonetes de Auer são estruturas sem origem definida, porém somente são vistos em células imaturas da linhagem mieloide (Figura 11.2). A seguir, apresenta-se uma classificação, de acordo com a frequência dos bastonetes de Auer:

- **LMA-M3**: múltiplos bastonetes de Auer (faggot cell).
- **LMA-M3v**: bastante frequente os bastonetes de Auer.
- **LMA-M2v**: frequente os bastonetes de Auer.
- **LMA-M2**: frequente ou não os bastonetes de Auer.
- **LMA-M1**: raros bastonetes de Auer.
- **LMA-M4**: raros bastonetes de Auer.
- **LMA-M4eo**: raros bastonetes de Auer.

RELAÇÃO NÚCLEO/CITOPLASMA

A relação núcleo/citoplasma é um dado importante na classificação dos blastos (Figuras 11.3 e 11.4). Quando um blasto apresenta uma alta relação núcleo/citoplasma, ou seja, o citoplasma dessa célula ocupa menos de 20% da superfície celular, a célula tem pouco citoplasma com relação ao núcleo. No entanto, uma baixa relação indica que a célula tem muito citoplasma com relação ao núcleo.

A classificação dos blastos em tipos I, II e III não é mais tão usada na moderna hematologia. No entanto, é importante conhecer essa classificação:

- **Blasto tipo I**: blasto indiferenciado, sem bastonetes de Auer, citoplasma agranular e com limites bem definidos de membrana nuclear.
  - *Exemplo*: blasto da leucemia mieloide aguda M0.
- **Blasto tipo II**: blasto diferenciado, bastonetes de Auer, menor definição nos limites da membrana nuclear e a presença de 20 grânulos azurófilos, em média, no citoplasma.
  - *Exemplo*: blasto da leucemia mieloide aguda M2.
- **Blasto tipo III**: blasto com hipergranulação atípica.
  - *Exemplo*: blasto da leucemia mieloide aguda M2v.

BUBBLES

Bubbles são projeções citoplasmáticas (bolhas) comuns em megacariócitos e proeritroblastos, que ocasionalmente podem ser vistas em outros blastos. As *bubbles* não têm valor clínico (Figuras 11.5 e 11.6).

CONTAGEM E DISTRIBUIÇÃO DOS LEUCÓCITOS NA LÂMINA

Muitos citologistas preferem pesquisar blastos no sangue periférico usando uma objetiva de pequeno aumento (10×), o que possibilita maior rapidez e a certeza de que toda a lâmina foi vista (Figuras 11.7 e 11.8). No caso de se encontrar células

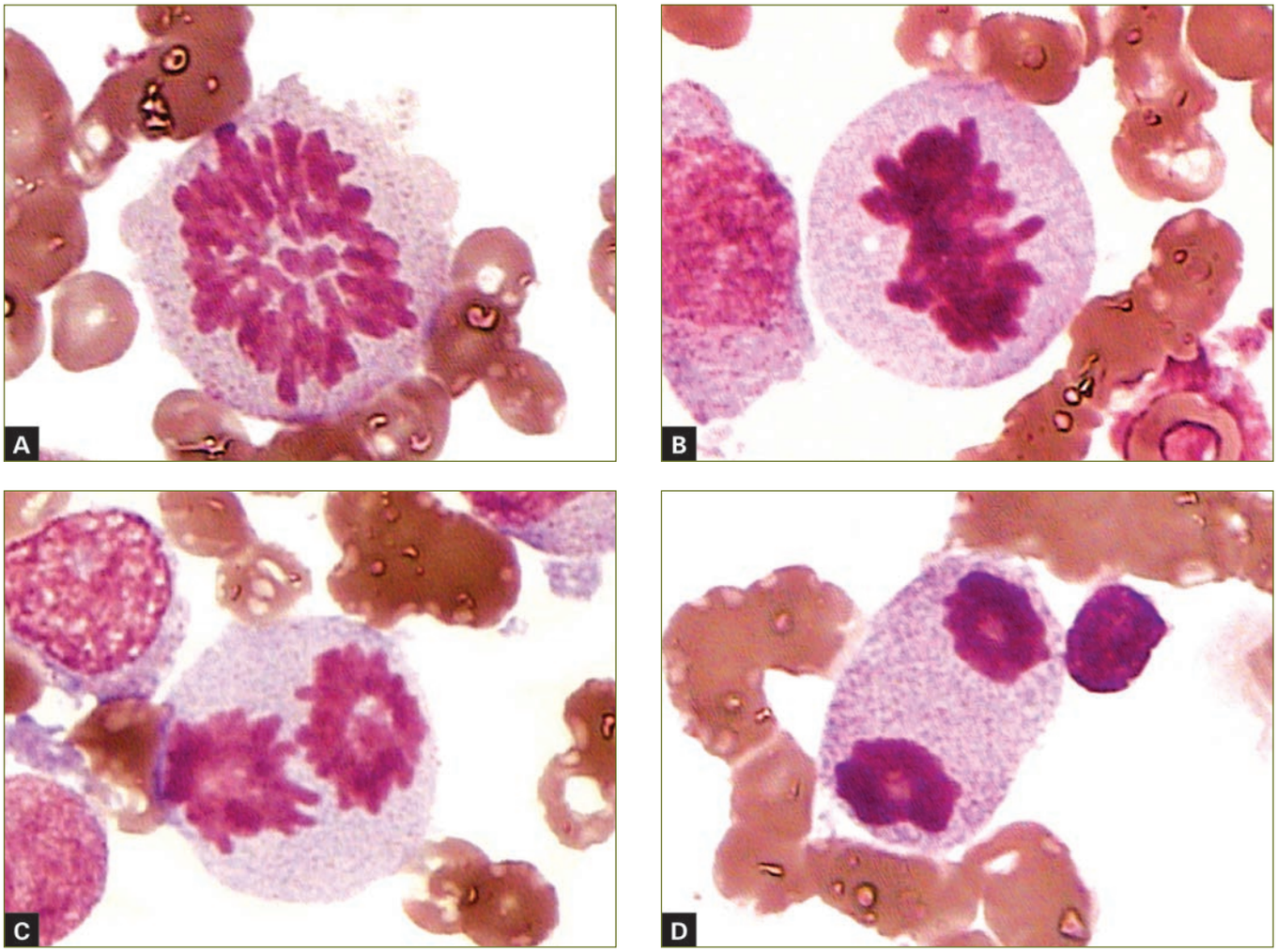


Figura 11.1 (**A** a **D**) Mitoses: blasto na fase prófase (**A**); metáfase (**B**); anáfase (**C**); e telófase (**D**) (2.000×)

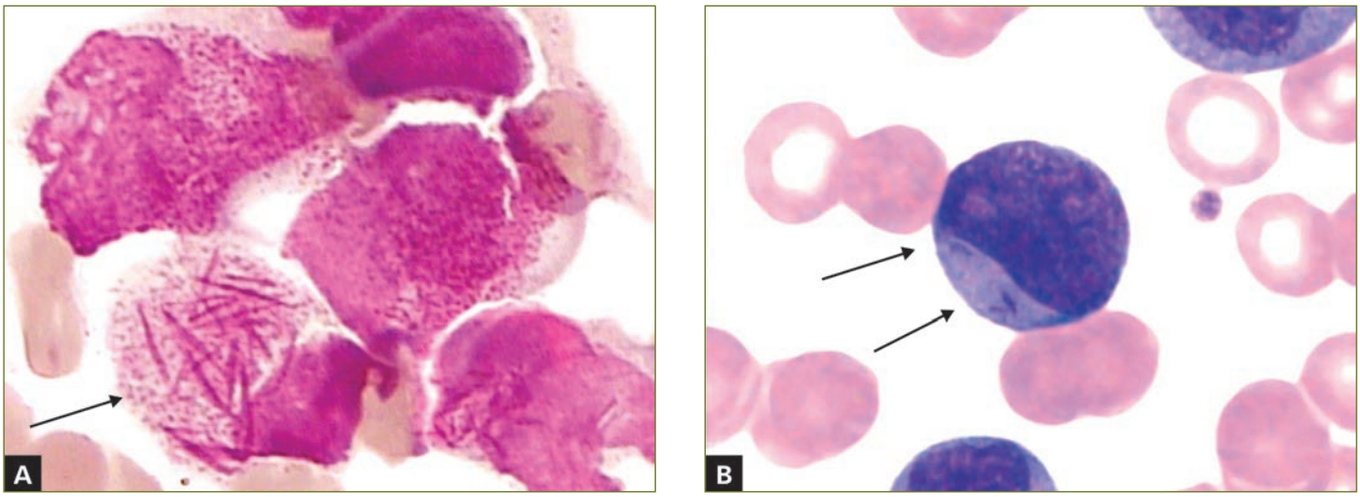


Figura 11.2 (**A** a **B**) Bastonetes de Auer. Promielócito com numerosos bastonetes de Auer (*faggot cell*) (*seta*) (**A**); e blasto mieloide com dois bastonetes de Auer (*setas*) (**B**) (2.000×)

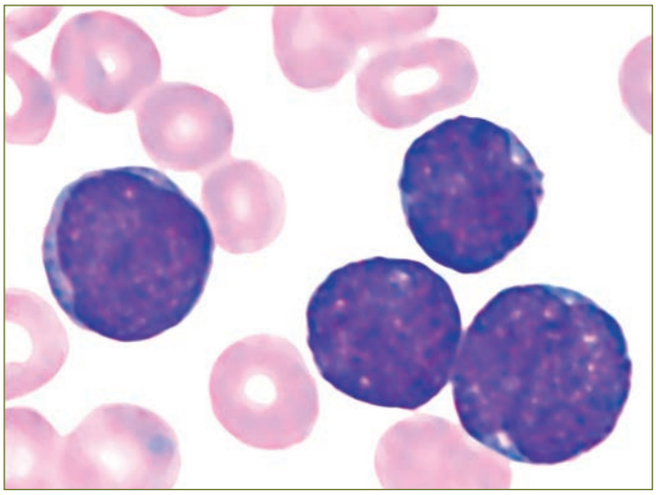


Figura 11.3 Blastos com alta relação núcleo/citoplasma (2.000×)

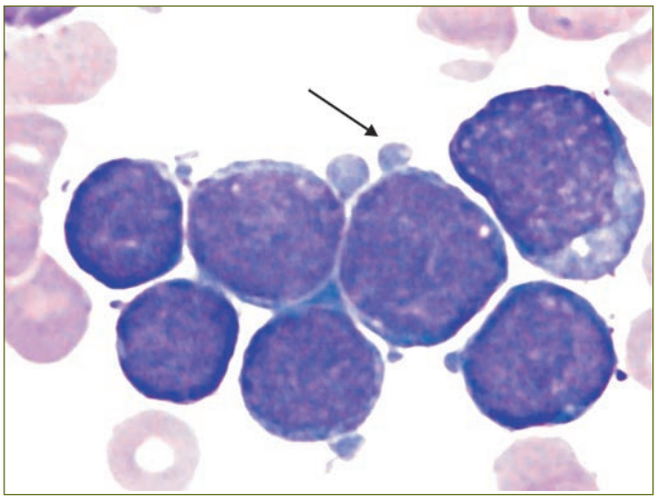


Figura 11.6 *Bubbles* (*seta*) (2.000×)

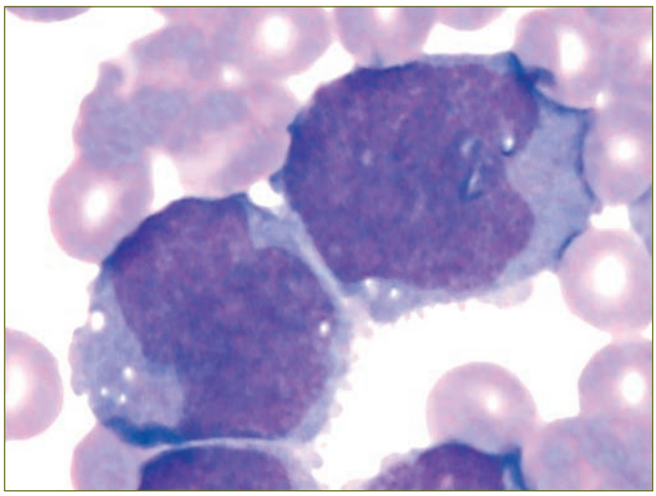


Figura 11.4 Blastos com baixa relação núcleo/citoplasma (2.000×)

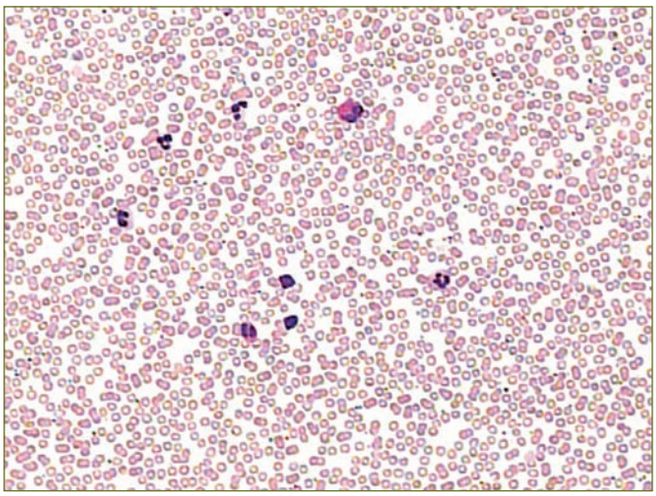


Figura 11.7 Contagem de leucócitos (10×)

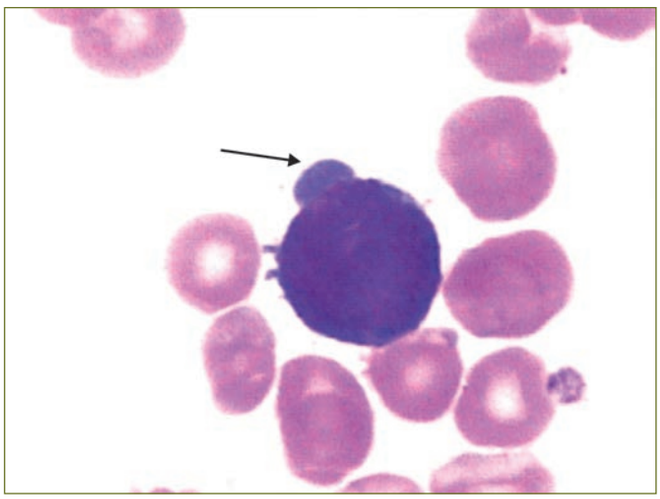


Figura 11.5 *Bubbles* (*seta*) (2.000×)

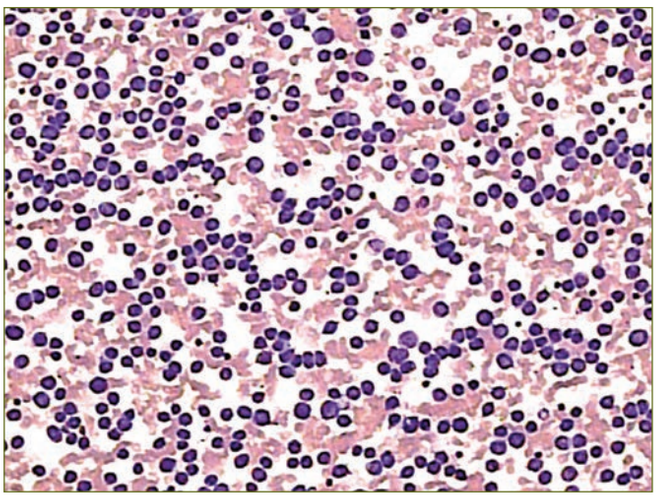


Figura 11.8 Hiperleucocitose (10×)

suspeitas, obtém-se o diagnóstico definitivo usando-se a objetiva de imersão (100×).

A observação ao pequeno aumento é ainda muito útil, pois possibilita uma melhor noção da contagem de leucócitos e de sua distribuição na lâmina. A seguir, há algumas comparações de fotos do sangue periférico de um paciente com LMA-M5 (com hiperleucocitose de 327 mil leucócitos/mm^3) com a de outro com contagem de leucócitos normal de 6 mil leucócitos/mm^3, ao aumento de 100×.

EOSINÓFILOS DE CAVALO

Na análise morfológica dos leucócitos no hemograma veterinário de cães, gatos, cavalos, bois, macacos, bodes, peixes-bois, entre outros, foi observado que apenas os eosinófilos dos equinos apresentavam características morfológicas diferentes de todos os outros leucócitos dos animais pesquisados. Nos esfregaços sanguíneos dos cavalos, observou-se um evidente aumento no tamanho dos grânulos eosinofílicos destas células e, consequentemente, diminuição no seu número, com média de apenas 50 grânulos por célula. Assim, promove-se uma característica morfológica única para o eosinófilo do cavalo (Figuras 11.9 a 11.11).

CÉLULAS ENDOTELIAIS NO ESFREGAÇO SANGUÍNEO

As células endoteliais revestem a superfície interna das câmaras do coração (aurículas e ventrículos), dos vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) e dos vasos linfáticos, formando o endotélio. No adulto, o endotélio pode chegar a pesar 1kg e medir 7m^2. É formado por um único estrato de células achatadas, sendo classificado como epitélio simples pavimentoso.

O endotélio funciona como uma membrana semipermeável, regulando o tráfego de moléculas. Entretanto, existe uma variação na estrutura destas células dependendo do órgão. Por exemplo, no fígado e no baço, o endotélio é descontínuo, o que possibilita o intercâmbio de substâncias. Enquanto isso, no cérebro, as células endoteliais são agrupadas firmemente formando a barreira hematoencefálica, que atua principalmente para proteger o sistema nervoso central de substâncias químicas presentes no sangue. Isso possibilita, ao mesmo tempo, a função metabólica normal do cérebro.

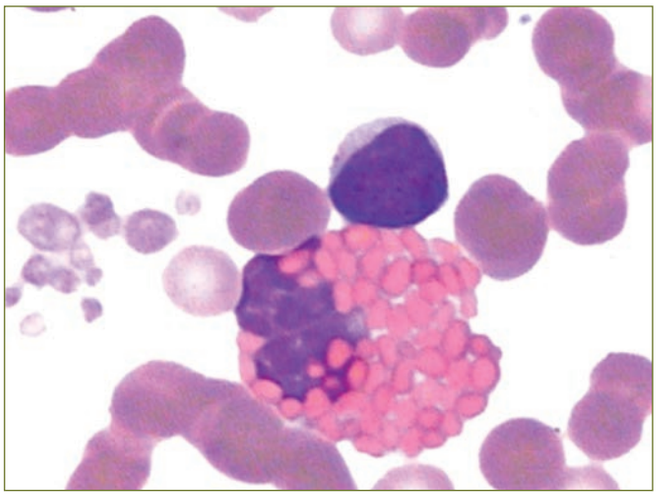


Figura 11.9 Eosinófilos de cavalo. Observa-se um aumento evidente no tamanho dos grânulos eosinofílicos e, consequentemente, diminuição no seu número (2.000×)

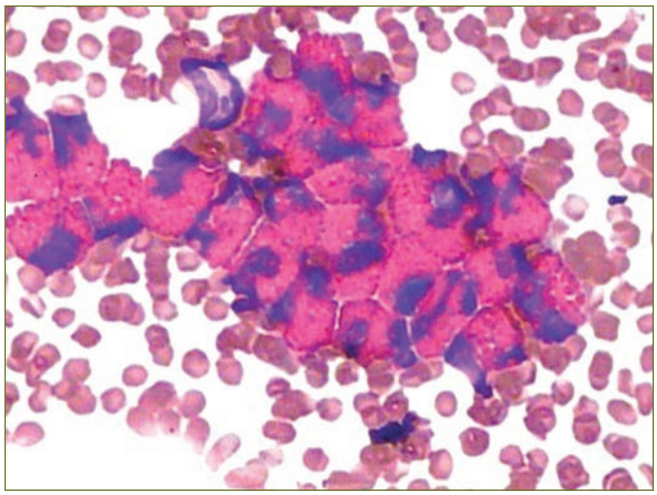


Figura 11.10 Evidente eosinofilia em cavalo (2.000×)

A principal função das células endoteliais é controlar o fluxo sanguíneo e a pressão arterial, por meio da secreção de vasodilatadores como o ácido nítrico. No entanto, as células endoteliais também apresentam funções de síntese de diversas substâncias, como a trombomodulina, a fibronectina e o colágeno, regulando o tônus vascular e garantindo uma superfície antitrombótica para o fluxo sanguíneo.

Durante a coleta do sangue para o hemograma e a confecção do esfregaço, as células endoteliais podem se descolar da veia durante a inserção ou a retirada da agulha utilizada na coleta. Tais células apresentam no esfregaço do sangue periférico morfologia bastante regular, com tamanho e estrutura nuclear uniformes (Figuras 11.12 e 11.13). Assim, seu reconhecimento torna-se mais fácil por estas células ocorrerem em uma fina camada ao longo do sentido do esfregaço e se apresentarem em grupamentos.

CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS NO ESFREGAÇO SANGUÍNEO

O epitélio bucal é constituído por células firmemente unidas umas às outras, arranjadas em camadas ou estratos distintos, formando um epitélio escamoso e estratificado. Tem como função primária a formação de uma barreira entre o meio bucal e os tecidos mais profundos. Sua integridade estrutural é mantida pelo processo de renovação celular contínuo. Tais células são produzidas nas camadas mais profundas do epitélio e migram para a superfície, substituindo as células descamadas.

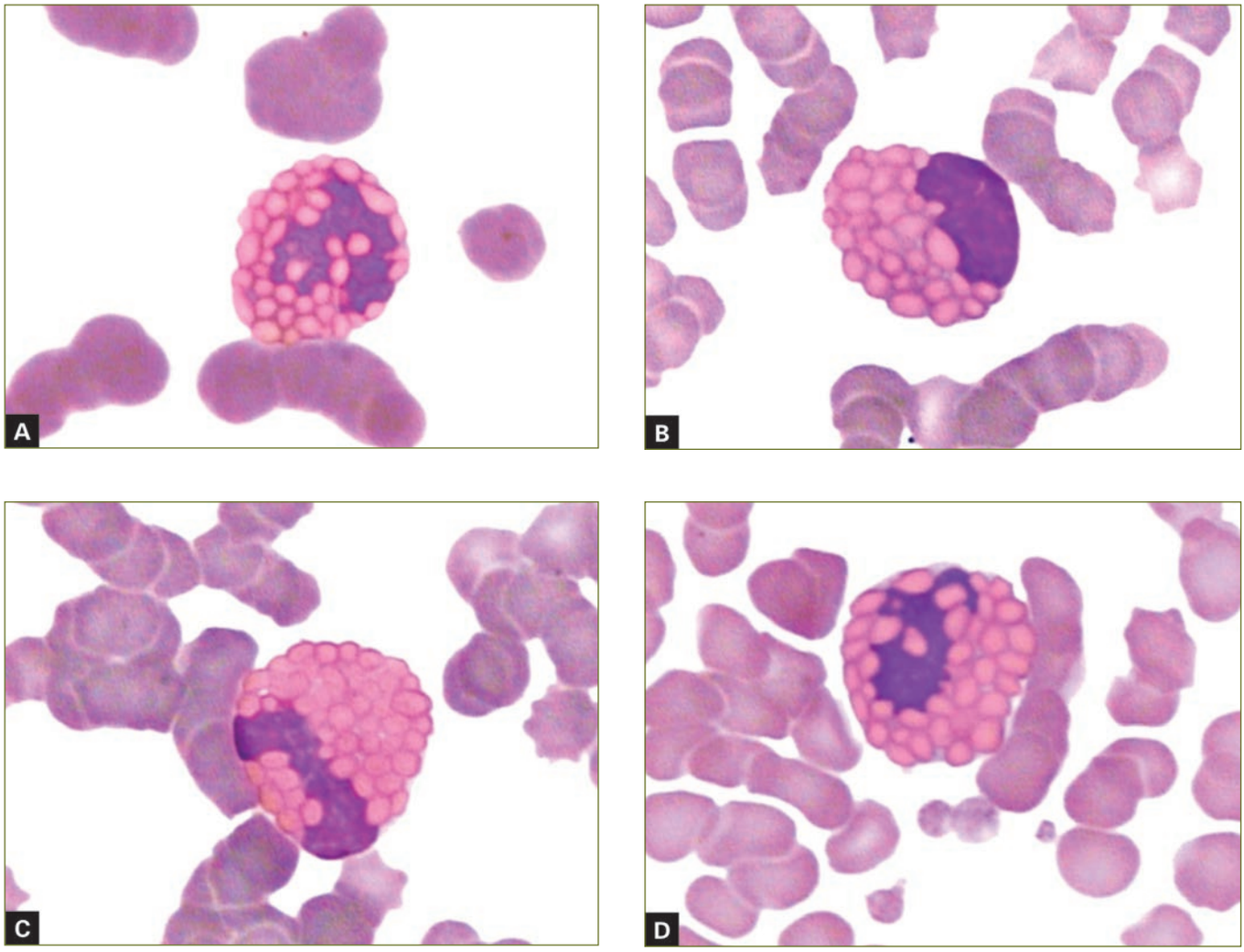


Figura 11.11 (**A** a **D**) Eosinófilo de cavalo. Observa-se um aumento evidente no tamanho dos grânulos eosinofílicos e, consequentemente, diminuição no seu número (2.000×)

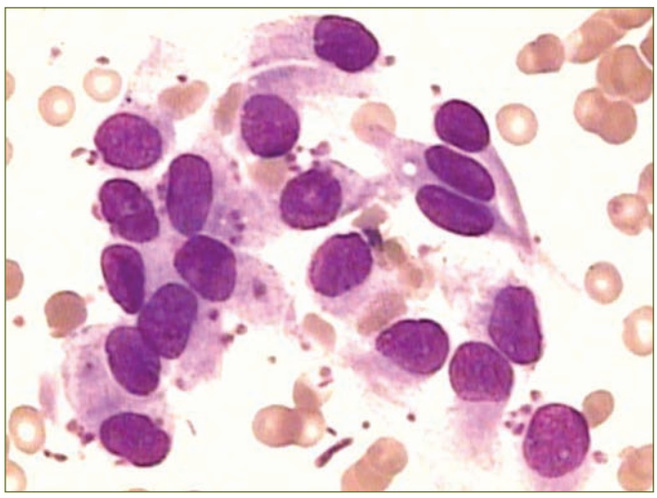


Figura 11.12 Células endoteliais em grupamentos no sangue periférico (800×)

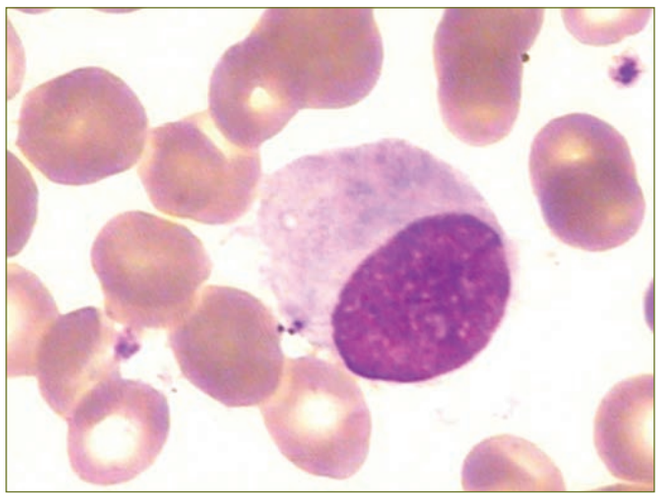


Figura 11.13 Célula endotelial no sangue periférico, isolada (2.000×)

As células epiteliais bucais no sangue periférico são consideradas como "células estranhas". Sua presença ocorre na preparação do esfregaço sanguíneo ou na secagem da lâmina, quando alguma microgota de saliva com uma ou mais células bucais caem sobre a lâmina, formando um halo ao redor da célula. Esta microgota tem a borda rósea e é constituída pela hemólise de hemácias causada pela saliva. São comuns nessas células bactérias do trato bucal (Figuras 11.14 e 11.15).

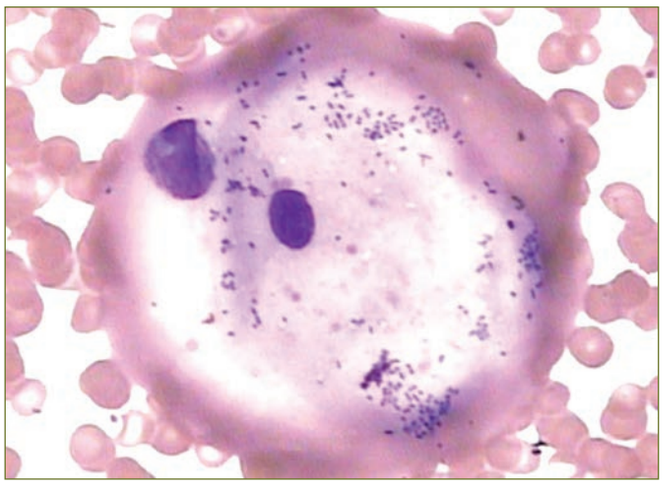


Figura 11.14 Célula epitelial bucal no sangue periférico: contaminação bacteriana intracelular e neutrófilo na margem envolvidos por um halo de hemólise causado pela microgota de saliva antes da coloração (1.200×)

CROMATINA SEXUAL NOS NEUTRÓFILOS

A cromatina sexual (corpúsculo de Barr ou cromossomo X inativado) é útil na determinação do sexo genético e no diagnóstico de anomalias cromossômicas ligadas ao sexo. No teste, a cromatina de Barr é negativa quando há ausência de baquetas em 200 neutrófilos contados, o que corresponde aos cromossomos 46XY (homens normais), 45X0 (síndrome de Turner) e

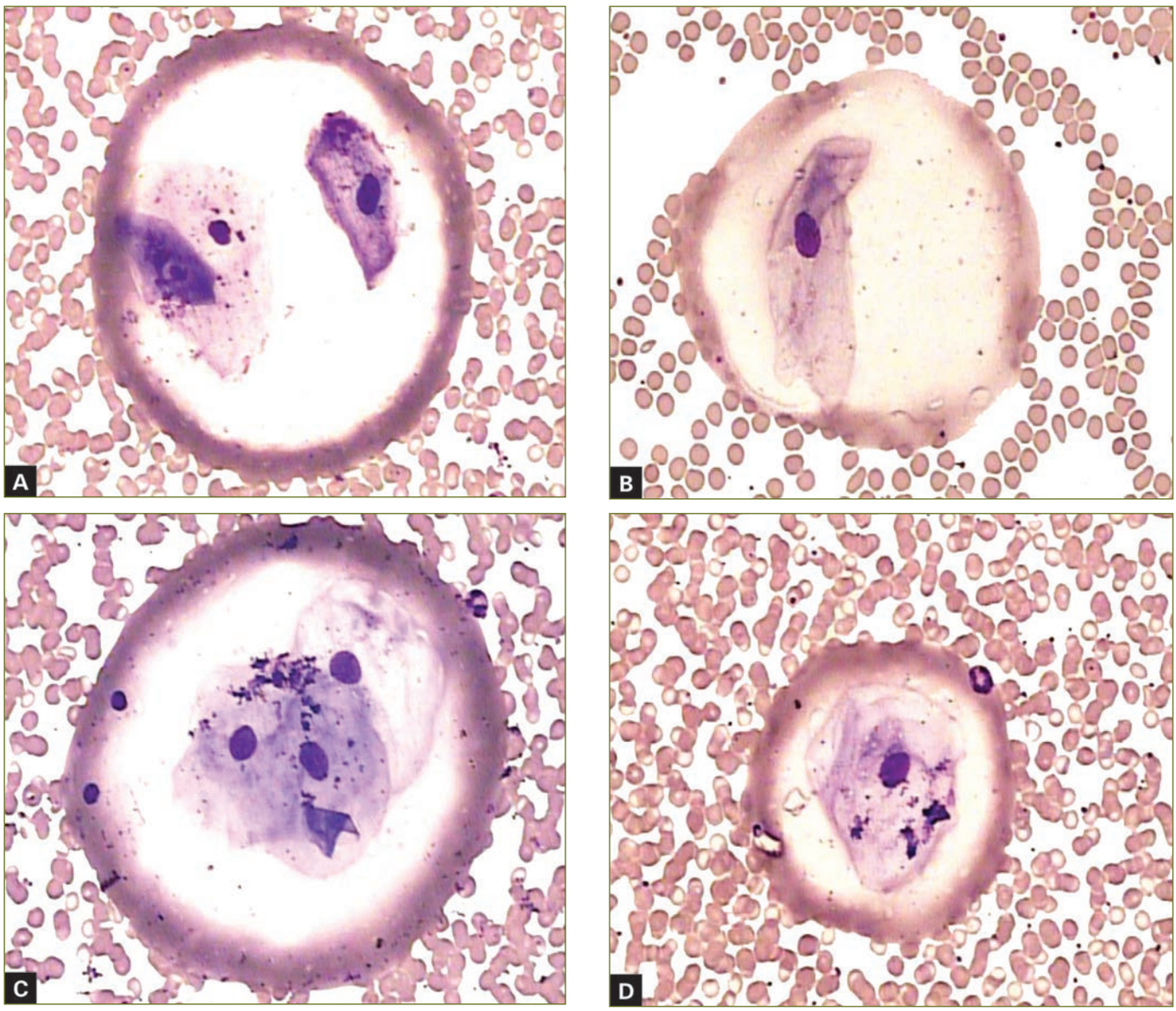


Figura 11.15 (**A** a **D**) Células epiteliais bucais no sangue periférico: envolvidas por um halo de hemólise causado por microgotas de saliva antes da coloração (800×)

47XYY. A cromatina Barr é positiva na presença de uma baqueta nos neutrófilos, que corresponde ao 46XX (mulheres normais), ao 47XXY (síndrome de Klinefelter) e ao 48XXYY, ou quando há duas baquetas nos neutrófilos relativos a mulheres 46XXX.

O corpúsculo de Barr corresponde a um cromossomo X que permanece condensado na interfase, estando assim inativo (Figuras 11.16 e 11.17). Essa inatividade do cromossomo X corresponde ao mecanismo chamado de "compensação de dose", que mantém constante a relação entre os cromossomos autossomos e o cromossomo X tanto em homens quanto em mulheres.

Durante o desenvolvimento embrionário feminino, o cromossomo X ora doado pelo pai ora doado pela mãe será inativado. Assim, em metade das células embrionárias, o cromossomo X doado pelo pai é inativo e na outra metade das células embrionárias o cromossomo X doado pela mãe é inativo.

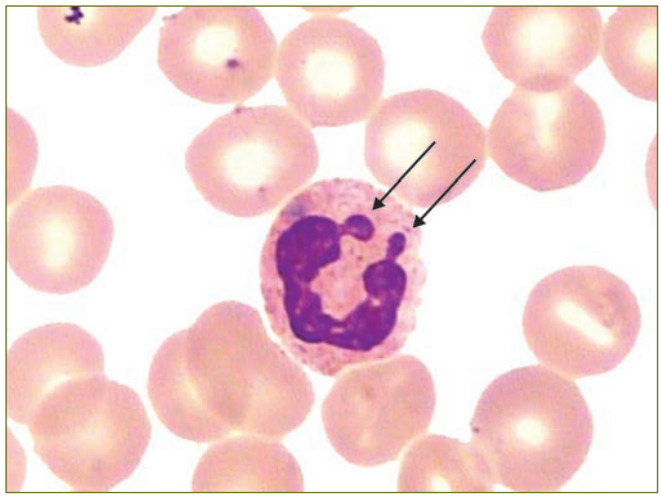


Figura 11.16 Corpúsculo de Barr: a presença de duas baquetas nos neutrófilos relaciona-se com mulheres 46XXX (2.000×)

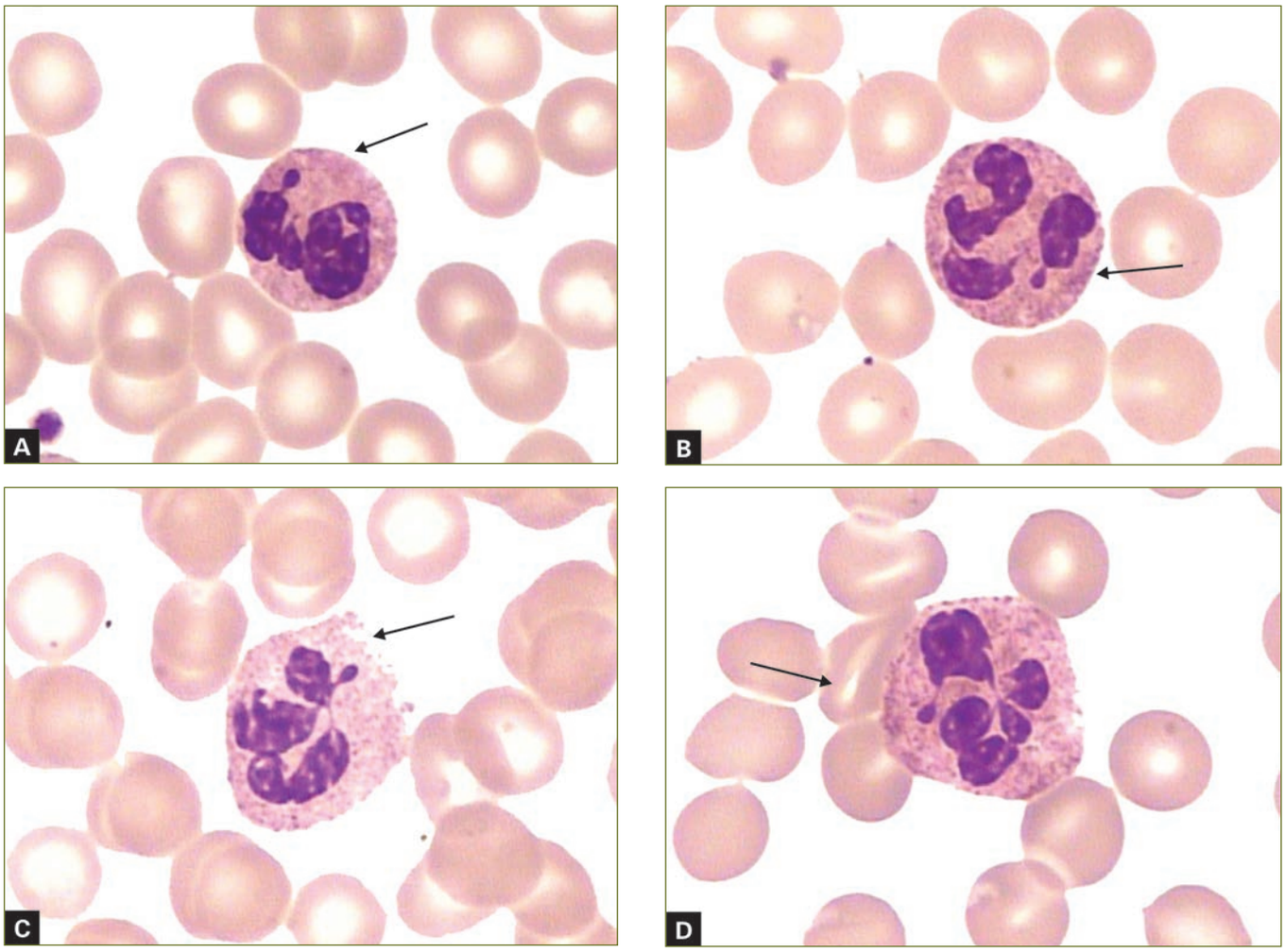


Figura 11.17 (**A** a **D**) Corpúsculo de Barr: a presença de uma baqueta nos neutrófilos relaciona-se com mulheres normais, 46XX (2.000×)

Toda mulher normal tem, então, uma população de células com um cromossomo X do pai ativo e outra população de células com um cromossomo X da mãe ativo. Desse modo, constitui o chamado mosaicismo (mosaico: indivíduo com duas populações celulares diferentes).

CÉLULAS LE

Em 1948, Hargreaves desenvolveu o primeiro teste para a detecção do lúpus eritematoso sistêmico (LES), a pesquisa de células LE. Essa pesquisa consiste em um exame microscópico de células do sangue periférico previamente danificadas e fagocitadas por neutrófilos em presença do fator antinúcleo. Dessa maneira, isso promove processos de núcleo-fagocitose e roseta.

Durante muito tempo, o fenômeno das células LE, causado pela imunoglobulina G (IgG) anticromatina que se liga ao núcleo de neutrófilos lesados, teve grande aplicabilidade clínica e alta especificidade para o diagnóstico de LES. Contudo, após uma década, observou-se que apenas 50% dos pacientes com LES eram detectados por este teste, demonstrando não ser adequadamente sensível. Ao final dos anos 1950, descobriu-se que uma alta porcentagem de pacientes com LES tinha anticorpos circulantes, os quais podiam ser detectados após contato com células de fígado ou rim de rato por imunofluorescência indireta. Esses testes foram chamados de pesquisa do fator antinúcleo (FAN).

Hoje, considera-se que a pesquisa das células LE não é recomendada unicamente para o diagnóstico dessa doença, devido à sua interpretação subjetiva, à baixa sensibilidade e à sua padronização inadequada. Assim, atualmente, a utilização de células de linhagem humana originárias de células tumorais provenientes do esôfago (HEp-2) é o método mais empregado para a detecção dos anticorpos antinucleares (ANA), com positividade superior a 99%. Essa alta positividade faz desse teste o mais sensível para o lúpus (Figuras 11.18 a 11.21).

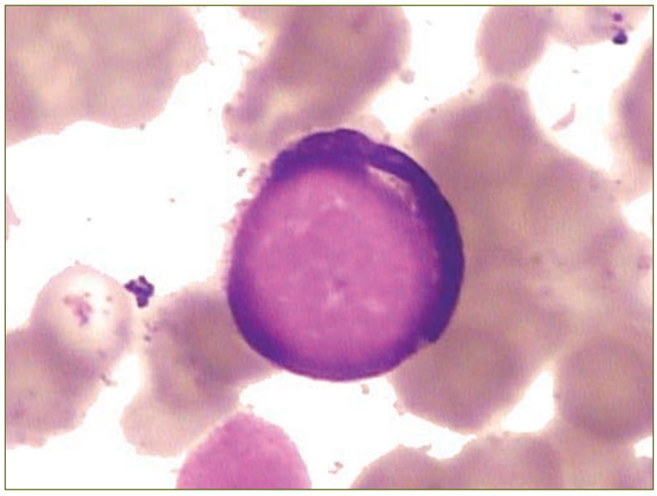


Figura 11.18 Lúpus eritematoso sistêmico: célula LE isolada, neutrófilo com massa nuclear homogênia fagocitada, com o núcleo na margem da célula (2.000×)

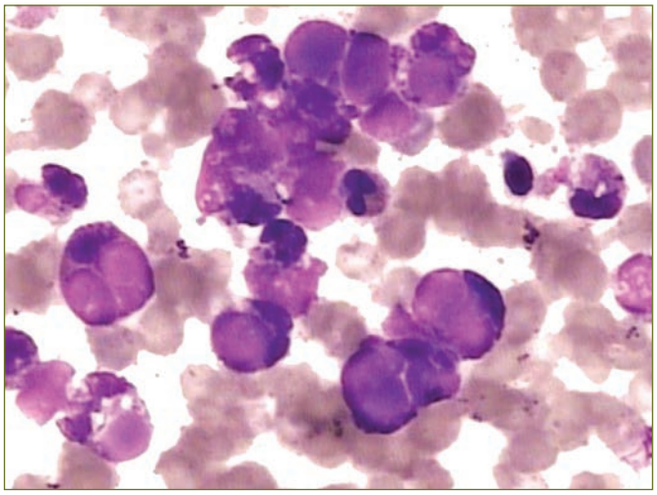


Figura 11.19 Lúpus eritematoso sistêmico: células LE, neutrófilos com massas nucleares homogênias fagocitadas, com o núcleo na margem da célula (800×)

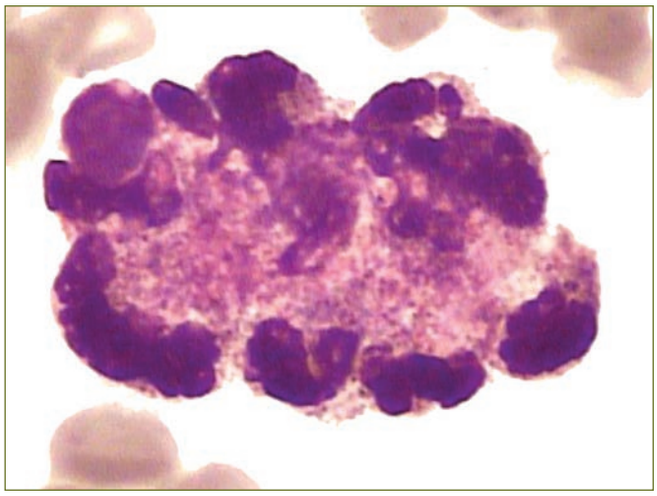


Figura 11.20 Lúpus eritematoso sistêmico: fenômeno de roseta (2.000×)

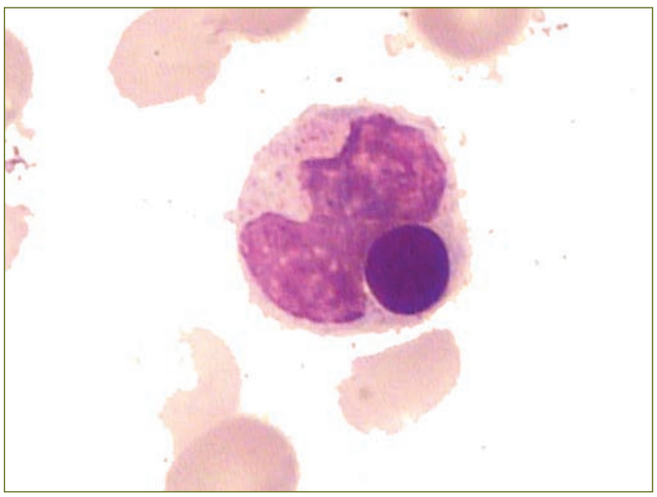


Figura 11.21 Monócito: linfofagocitose – fenômeno não específico do lúpus eritematoso sistêmico (2.000×)

APOPTOSE DE NEUTRÓFILOS

Nos esfregaços do sangue periférico, o fenômeno morfológico da apoptose, a morte celular programada, é um episódio muito raro de ser observado. Entretanto, o material confeccionado durante mais de 8h de conservação com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pode provocar esse fenômeno, mas por motivo de deterioração celular. As características morfológicas da célula em apoptose são muito marcantes. A apoptose é um fenômeno bastante rápido e nele ocorre uma condensação da cromatina, que se apresenta de modo picnótico e promove uma retração celular (Figuras 11.22 a 11.25).

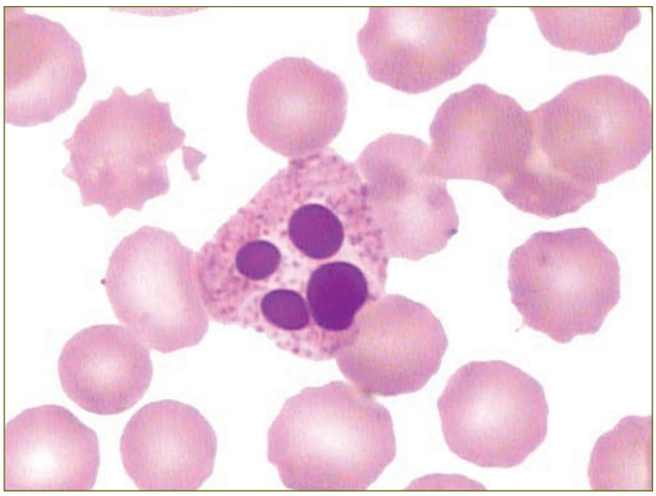


Figura 11.22 Apoptose: morte celular programada. Neutrófilo com cromatina condensada (picnótica) (2.000×)

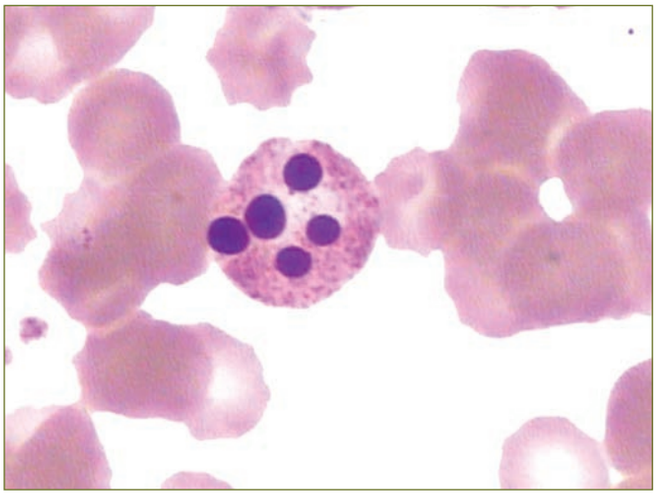


Figura 11.23 Apoptose: morte celular programada. Neutrófilo com cromatina condensada e separada em cinco partes (picnóticas) (2.000×)

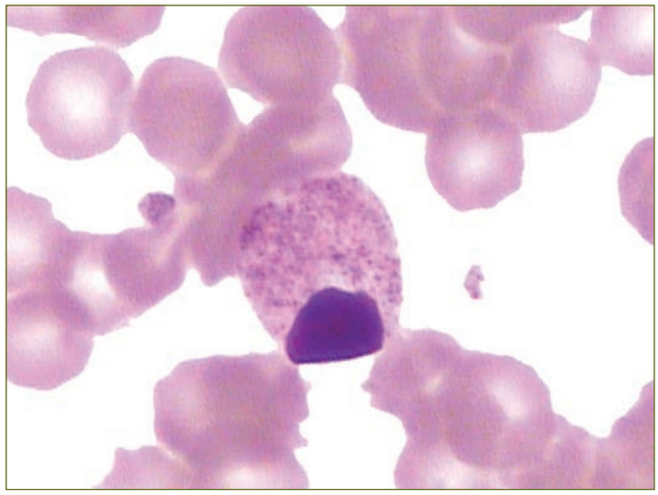


Figura 11.24 Apoptose: morte celular programada. Neutrófilo com cromatina condensada (picnótica) e retraída na lateral da célula (2.000×)

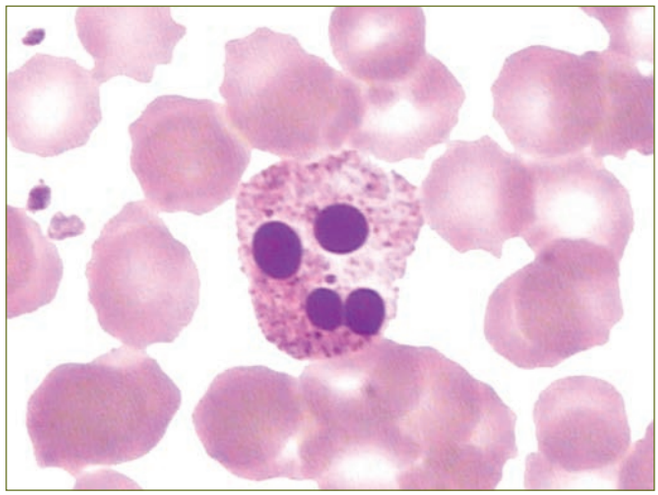


Figura 11.25 Apoptose: morte celular programada. Neutrófilo com cromatina condensada e separada em quatro partes (picnóticas) (2.000×)

De acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, os processos de morte celular podem ser classificados em apoptose, autofagia, necrose e mitose catastrófica. As alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na formação de tumores. A apoptose é a morte programada de células desnecessárias. Assim, diferencia-se da necrose, em que a morte da célula é provocada por uma lesão aguda.

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência. Peptidases específicas, as caspases, destroem as proteínas que formam o citoesqueleto, requerendo a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequências de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados.

PSEUDOANOMALIA DE PELGER-HÜET

A anomalia benigna de Pelger-Hüet pode surgir em vários tipos de neoplasias hematológicas na forma de pseudoanomalia de Pelger, o que geralmente ocorre logo após exposição a alguns medicamentos (Figura 11.26). As leucemias com maior incidência dessa anomalia são:

- LMC.
- LMA-M2.
- LMA-M2v.
- LMA-M4eo.
- Mielofibrose.
- Síndromes mielodisplásicas.

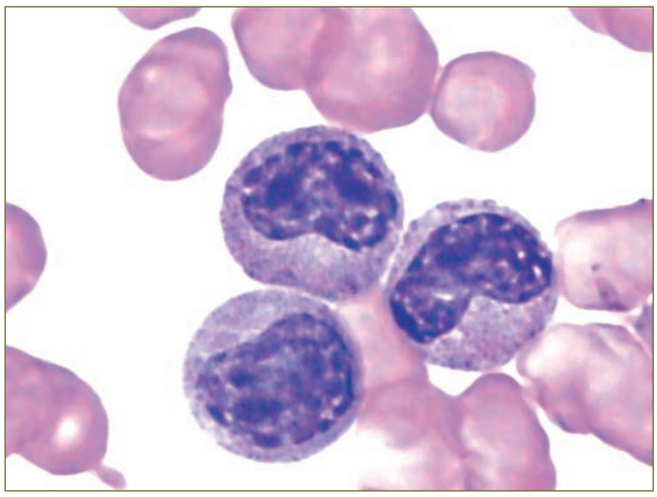
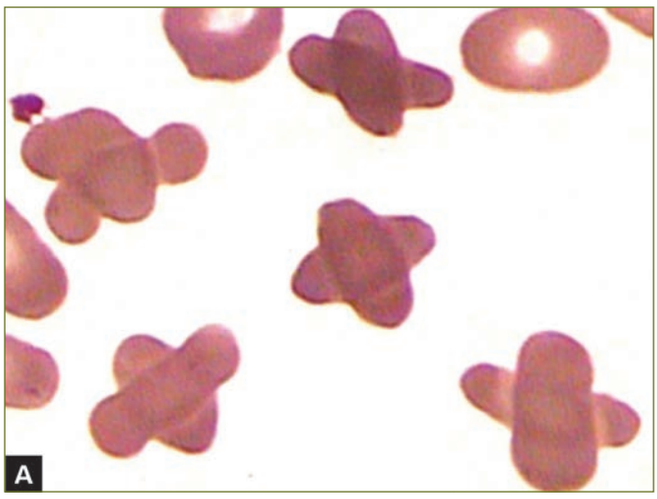
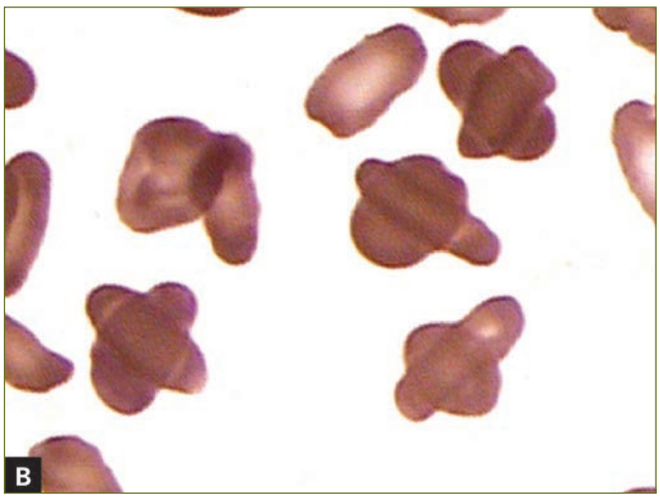


Figura 11.26 Pseudoanomalia de Pelger-Hüet (homozigota). Os núcleos de todos neutrófilos são ovalados ou arredondados, sem segmentação (2.000×)

HEMÁCIAS "CRUZADAS"

Os fenômenos de aglutinação das hemácias mais conhecidos são os de *rouleaux* eritrocitário e os provocados por anticorpo frios ou quentes. Entretanto, foram observadas numerosas hemácias "cruzadas" por campo, sobrepostas em forma de "X" com alterações de cargas elétricas em raros pacientes com eliptocitose hereditária (Figuras 11.27 e 11.28).





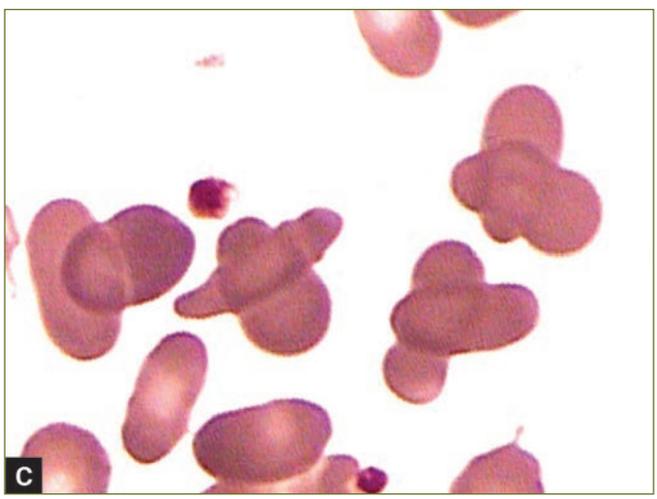


Figura 11.27 (**A** a **C**) Sangue periférico: hemácias "cruzadas" (2.000×)

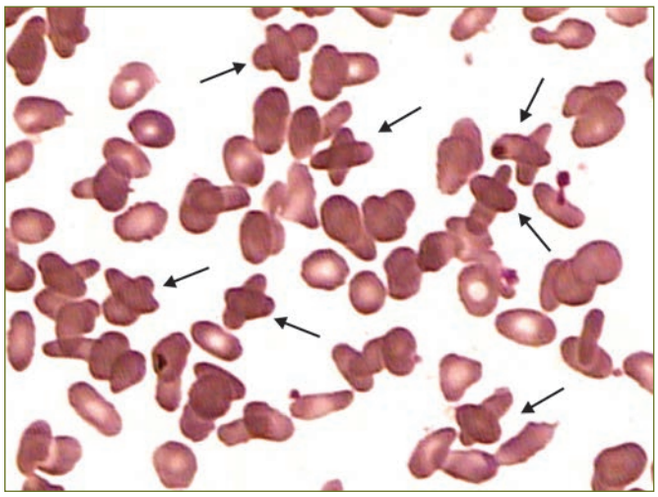


Figura 11.28 Sangue periférico: hemácias "cruzadas" (*setas*) (1.200×)

Em pacientes apresentando este fenômeno, o sangue foi lavado com solução salina a 0,9% por cinco vezes. Após a lavagem, foram confeccionados alguns esfregaços e, na pesquisa citológica, as hemácias "cruzadas" desapareceram, comprovando a alteração de cargas elétricas entre as hemácias, anulada pela lavagem (técnica sugerida pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum).

FORMAÇÃO DA SOMBRA NUCLEAR

As manchas ou sombras nucleares, quando formadas por linfócitos da leucemia linfoide crônica, são denominadas sombras nucleares de Gumprecht. Essas sombras são formadas a partir da fragilidade dos linfócitos leucêmicos. A Figura 11.29 revela o momento exato da formação da sombra nuclear.

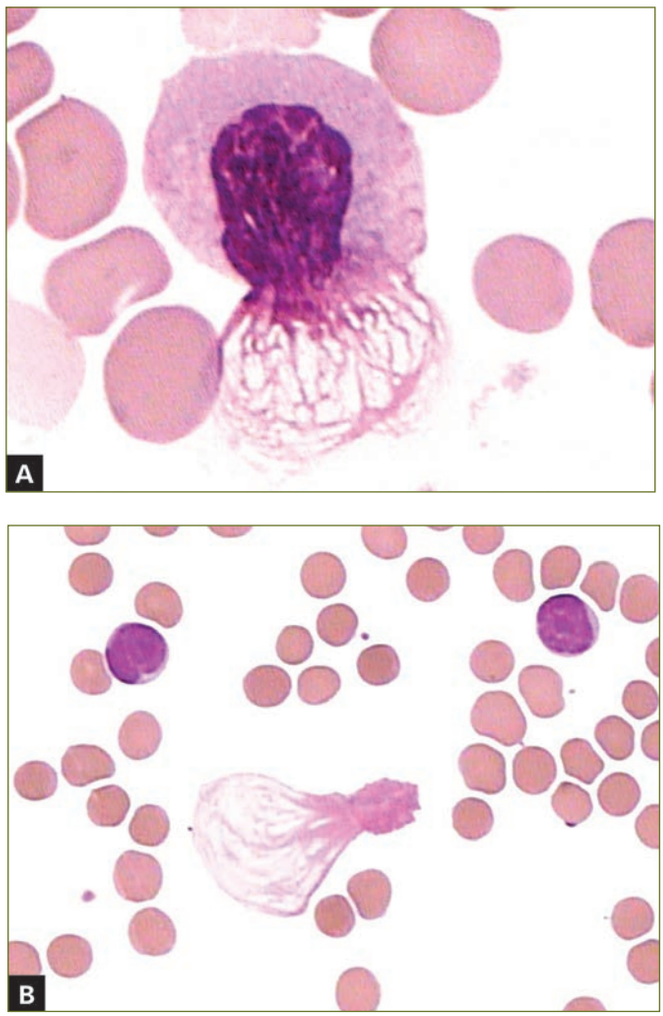


Figura 11.29 (**A** e **B**) Formação da sombra nuclear de Gumprecht: o linfócito leucêmico aumenta de tamanho e a cromatina se desfaz (2.000×)

Laboratorio de Hematologia - cap-11.indd 256 24/09/2014 10:26:04

Bibliografia Consultada

Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. Am J Clin Pathol. 2003; 119(5):672-80.

Bain BJ. Células sanguíneas: um guia prático 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 1997.

Balabanian K1, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, Lebbe C, Kerob D, Dupuy A, Hermine O, Nicolas JF, Latger-Cannard V, Bensoussan D, Bordigoni P, Baleux F, Le Deist F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Bachelerie F. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL 12. Blood. 2005; 105(6):2449-57.

Bentler E, Lichtman MA, Kipps TJ (Eds.). Williams hematology. 7. ed. New York: Mcgraw-Hill Medical; 2006.

Beutler E. G6PD deficiecy. Blood. 1994; 84(11):3613-36.

Brunetti-Pierri N, Scaglia F. GM1 gangliosidosis: review of clinical, molecular, and therapeutic aspects. Mol Genet Metab. 2008; 94(4):391-6.

Burgess LJ. Biochemical analysis of pleural, pritoneal and pericardial effusions. Clin Chim Acta. 2004; 343(1-2):61-84.

Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:163-83.

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Mechanisms of disease chronic lymphocytic leukemia. N Eng J Med. 2005; 352:804-15.

Comar SR. Procedimento operacional padrão- roteiro para análise de liquido ascítico. Curitiba: HC/UFPR; 2009.

Dacie JV, Lewis SM. Investigation of the hereditary haemolytic anemias. In: Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 6. ed. New York: Churchill Livingstone; 1984. p. 159-68.

Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg F; EFNS Task Force. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. Eur J Neurol. 2006; 13(9):913-22.

Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. Oncologist. 2009; 14(11):1070-82.

Fenneteau O. Anomalías morfológicas de los leucócitos en el niño. Acta Bioquímica Clínica Latino-Am. 2009; 43(4):667-77.

Fisch P, Handgretinger R, Schaefer HE. Pure red cell aplasia. Brit J Haematol. 2000; 111(4):1010-22.

Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D. Bone marrow pathology. 2. ed. Chicago: ASCP; 2001.

Freitag JJ, Miller LW. Manual of Medical Therapeutics. 23. ed. Boston: Little, Brown Co.; 1980.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997; 89(6):2079-88.

Griffin N. The bethesda handbook of clinical hematology. 2. ed. Philadelphia, USA: Wolter Kluwer; 2005.

Grignaschi, Koziner, Larripa, Lucero. Diagnóstico citológico de las hemopatías. 1. ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1991

Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu ZF, Wittes J, Berger KI, Newman MS, Lowe AM, Kakkis E, Swiedler SJ. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: a phase 3, randomized, Double-blind, placebo-controll, multinational study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase (recombinant human arysulfatase B or rhASB) and follow-on, open-label extension study. J Pediatrics. 2006; 148(4):533-9.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-american classification of lymphoid neoplasms: a proposalform the international lymphoma study group. Blood. 1994; 84(5):1361-92.

Hayhoe FGJ, Flemans R. Atlas colorido de citologia hematológica. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1997.

Heckner F, Lehmann HP, Kao YS. Hematologia microscópica prática: manual para o laboratório clínico. 4. ed. São Paulo: Santos; 1987.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chonic myeloid leukemia. Lancet. 2007; 370(9584):342-50.

Henry JB, Nelson DR, Tomar HJ. Washington A. Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais 18. ed. São Paulo: Manole; 1995

Hoffbrand AV, Pettit JE. Color atlas of clinical hematology 2. ed. London: Mosby-Wolf; 1994

Jaffe ES Harris NL, Stein H, Vardiman JV (Eds.). Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.

Kitchens CS, Alving BM, Kessler CM. Consultative hemostasis and thrombosis. Cambridge: Elsevier Science; 2002.

Kjeldsberg C, Knight J. Body fluids – Laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous e synovial fluids. 3. ed. Chicago: ASCP; 1992.

Kuiper JJ, van Buuren HR, de Man RA. Ascites in cirrhosis: a review of management and complications. Neth J Med. 2007; 65(8):283-8.

Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-Cell lymphomas. N eng J Med. 1999; 341(20):1520-9.

Lange O. Sobre as células eosinófilas do líquido cefalorraquidiano. Rev Neurol Psiquiatr. 1935; 1:421.

Leibovitch I, Mor Y, Colomb J, Ramon. The diagnosis and management of postoperative chylous ascites. J Urol. 2002; 167(2 Pt 1):449-57.

Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. Williams hematology. 7. ed. New York: Mcgraw-Hill Medical; 2006.

Lorenzi TF. Manual de hematologia propedêutica e clínica. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1999.

Lukens JN. Anemias hemolíticas hereditárias associadas a anormalidades da glicósile anaeróbica dos eritrócitos e metabolismo dos nucleotídeos. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN (Eds.). Wintrobe hematologia clínica. São Paulo: Manole; 1998. p. 1084-100.

Macdonald GA, Paul J, Cruickshawk B. Atlas de hematologia. 5. ed. Toronto: Editorial Médica Panamericana; 1988.

Motta VM, Corrêa JA, Motta LR. Gestão da qualidade no laboratório clínico. 2. ed. Porto Alegre: Médica Missau; 2001.

Mufti GJ, Flandrin G Schaefer HE, Sandberg AA, Kanfer EJ. An atlas of malignant haematology, citology, histology and cytogenetcs. 1. ed. London: Lippincott-Raven; 1996.

Naeim F, Rao PN, Grody WW. Hematopathology. 1. ed. Amsterdam, The Netherland: Elservier; 2008.

Naoum FA. Doenças que alteram os exames hematológicos. 1. ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

Naoum PC, Naoum FA. Doença das células falciformes. São Paulo: Sarvier; 2004.

Naoum PC. Eletroforese – técnicas e diagnósticos. 2. ed. São Paulo: Santos; 1999. p. 154.

Newslab. Certificação, Acreditação e Controle de Qualidade em Laboratórios Clínicos. Caderno Especial, nº 53, ano X; 2002.

Noum FA, Naoum PC. Hematologia laboratorial – leucócitos 1. ed. São José do Rio Preto: Academia de Ciências e Tecnologia; 2006. p. 91-8.

Noum PC. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier; 1997.

Oliveira CA, Mendes ME (Orgs.). Gestão da fase analítica do laboratório – como assegurar a qualidade na prática. 1. ed. Rio de Janeiro: Controllab; 2011.

Oliveira PN. Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnósticos por técnicas laboratoriais. 1. ed. São Paulo: Rocca; 2004.

Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, Matutes E, Milligan D; Guidelines Working Group of the UK CLL Forum. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2004. 125(3):294-317.

Owaidah TM, Al Beihany A, Iqbal MA, Elkum N, Roberts GT. Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia indentified by the EGIL scoring system. Leukemia. 2006; 20(4):620-6.

Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL, Eliason MT, Holman RC, Guarner J, Shieh WJ, Zaki SR. Pathology and pathogenesis of fatal Bordetella pertussis infection in infants. Clin Infect Dis. 2008; 47(3):328-38.

Paes RAP et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de Hematopatologia da Sociedade Brasileira de Patologia. J. Bras. Patol. Med. Lab Rio de Janeiro. 2002; 38(3).

Pereira I, George TI, Arber DA. Atlas of peripheral blood – the primary diagnostic tool. 1. ed. Philadelphia: Wolters Kluewer Health/Lippincott Willams e Wilkins; 2001.

Premalata C, Devi L, Madhumathi DS, Appaji L. Chediak-Higashi syndrome masquerading as acute leukemia: the significance of lymphocyte inclusions. J Clin Oncol. 2006; 24(21):3505-707.

Puccioni-sohler M, Brandão CO. Manual de análise do líquido cefalorraquidiano (LCR). Rio de Janeiro: Neurolife Laboratórios; 1996.

Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008; 371(9617):1030-43.

Pujol-Moix N, Kelley MJ. Hernandez A, Muniz-Diaz E, Espanõl I. Ulttrastuctural analysis of granulocyte inclusions in genetically confirmed MYH9- related disorders. Haematologica. 2004; 89(3):330-7.

Rapaport SI. Hematologia introdução. 2. ed. São Paulo: Rocca; 1990.

Ravel R. Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Reis JB, Reis Filho JB. Líquido cefalorraquidiano. São Paulo- Sarvier; 1980.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Patologia estrutural e funcional. 3. ed. Cambridge: Elsevier Science; 1996.

Rodak B, Fristma GA, Doig K. Hematology – clinical principles and applications. 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders; 2007.

Rodrigues MMA. Gestão Laboratorial e Sistema de Gestão da Qualidade – II curso de atualização em análises clínicas. Minas Gerais: SBACMG; 2001.

Roth E. Como implantar a qualidade em laboratório clínico – O caminho das pedras. Rio de Janeiro: Hunsdale Consultorias e Treinamento Ltda; 1998.

Smith H. Anomalies of leucocyte structure. Diagnosis in pediatric haematology. New York: Churchill Livingstone; 1996. p. 201-38.

Strasinger SK. Uroanálise e fluidos biológicos. 3. ed. São Paulo: Editorial Premier; 2000.

Terra P. Coagulação – interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2001.

Turgeon ML. Clinical hematology: theory and procedures. 2. ed. New York: Brown & Company; 1993.

Valayannopoulos V1, Nicely H, Harmatz P, Turbeville S. Mucopolisaccharidosis VI. Orphanet J. Rare Dis. 2010; 5: 5:5. doi: 10.1186/1750-1172-5-5.

Vardiman JW. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1 positive. Am J Clin Pathol. 2009; 132(2):250-60.

Vonderheid EC, Sobel EL, Nowell PC, Finan JB, Helfrich MK, Whipple DS. Diagnostic and prognostic significance of Sézary cells in peripheral blood smears from patients with cutaneous T-cell lymphoma. Blood. 1985; 66(2):358-66.

Wallach J. Interpretação de exames laboratoriais. 7. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Wintrobe GR, Thomas CB, Foerter J, Atkens J, Lukens WJN. Hematologia clínica. 1. ed. São Paulo: Manole; 1998.

Wong CL, Holroyd-Leduc J, Thorpe KE, Straus SE. Does this patient have bacterial peritonitis or portal hypertension? How do I perform a paracentesis and analyse the results? JAMA. 299(10):1166-78.

Wong TY, Chan PK, Leung CB, Szeto CC, Tam JS, Li PK. Parvovirus B19 infection causing red cell aplasia in renal transplantation on tracrolimus. Am J Kidney Dis. 1999; 34(6):1132-6.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia fundamentos e prática. 1. ed. São Paulo: Atheneu; 2001